

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019047

International filing date: 20 December 2004 (20.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-423774
Filing date: 19 December 2003 (19.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 2 3 7 7 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 2 3 7 7 4]

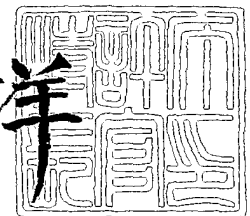
出 願 人 環 境 エ ン ジ ニ ア リ ン グ 株 式 会 社
Applicant(s): 独 立 行 政 法 人 産 業 技 術 総 合 研 究 所

2 0 0 5 年 2 月 3 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 EN0301118
【提出日】 平成15年12月19日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 01/00
C12Q 01/64

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 中村 和憲

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 金川 貴博

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 野田 尚宏

【発明者】
【住所又は居所】 東京都新宿区大久保 3 - 4 - 1 早稲田大学理工学部内
【氏名】 常田 聡

【発明者】
【住所又は居所】 東京都新宿区大久保 3 - 4 - 1 早稲田大学理工学部内
【氏名】 谷 英典

【発明者】
【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1 - 9 - 8 環境エンジニアリング株式会
社内
【氏名】 蔵田 信也

【特許出願人】
【識別番号】 000156581
【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社

【特許出願人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】
【識別番号】 100077698
【弁理士】
【氏名又は名称】 吉田 勝広

【選任した代理人】
【識別番号】 100098707
【弁理士】
【氏名又は名称】 近藤 利英子

【持分の割合】 35/100

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 010135
【納付金額】 7,350円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9717259

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

下記のタイプの一種若しくは複数種の標的核酸プローブ、当該核酸プローブと同数種の下記のタイプの内部標準核酸並びに当該内部標準核酸と同数種の下記のタイプの内部標準核酸プローブを含むことを特徴とする一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための核酸測定用新規混合物（以下単に新規混合物という。）。

標的核酸プローブ：標的核酸、内部標準核酸の両方にハイブリダイズするが、内部標準核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも、標的核酸とハイブリダイズしたときのみ蛍光キャラクター変化量が大きいという特徴を有する蛍光色素で標識した核酸プローブ。

内部標準核酸プローブ：標的核酸、内部標準核酸の両方にハイブリダイズするが、標的核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも、内部標準核酸とハイブリダイズしたときのみ蛍光キャラクター変化量が大きいという特徴を有する蛍光色素で標識した核酸プローブ。

内部標準核酸：上記の核酸プローブが、本核酸にハイブリダイズしたとき、標的核酸プローブの蛍光キャラクター変化量よりも、内部標準核酸プローブの蛍光キャラクター変化量が大きくなるような塩基配列を有する内部標準核酸。

【請求項 2】

標的核酸プローブと内部標準プローブの塩基配列の鎖長が同じである請求項 1 に記載の新規混合物。

【請求項 3】

標的核酸プローブと内部標準プローブの塩基配列が同じである請求項 1 又は 2 に記載の新規混合物。

【請求項 4】

標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が 5' 末端である請求項 1 ～ 3 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 5】

内部標準プローブの蛍光色素標識部位が 3' 末端である請求項 1 ～ 4 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 6】

標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が 5' 末端で、内部標準プローブの蛍光色素標識部位が 3' 末端である請求項 1 ～ 5 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 7】

標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が 3' 末端である請求項 1 ～ 3 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 8】

内部標準プローブの蛍光色素標識部位が 5' 末端である請求項 1 ～ 4 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 9】

標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が 3' 末端で、内部標準プローブの蛍光色素標識部位が 5' 末端である請求項 1 ～ 3 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 10】

標的核酸プローブ及び内部標準プローブが、1本鎖のオリゴヌクレオチドの1部位（末端塩基部、塩基部、鎖中部を含む。以下同じ意味を有する。）の塩基シトシン（C）部位（塩基部、糖部、リン酸部を含む。以下同じ意味を有する。）を、ハイブリダイゼーションにより蛍光キャラクターが変化する蛍光色素で標識した核酸プローブである請求項 1 ～ 9 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 11】

標的核酸プローブ及び内部標準プローブがQプローブである請求項 1 ～ 10 の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 12】

標的核酸プローブ及び内部標準プローブが、1本鎖のオリゴヌクレオチドの1つの部位を、ハイブリダイズした際に、蛍光強度を上昇させるような性質を有する蛍光色素で標識した核酸プローブである請求項1～9の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 13】

標的核酸プローブ及び内部標準プローブが、それぞれ蛍光キャラクターの異なる1種以上の色素で標識した核酸プローブである請求項1～12の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 14】

下記タイプの内部標準核酸と下記タイプの二重標識核酸プローブの一对の一種若しくは複数種を含むことを特徴とする一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物（以下単に新規混合物という。）。

二重標識核酸プローブ：1本鎖のオリゴヌクレオチドの部位1（末端塩基部、鎖中部を含む。）を、標的核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量が、内部標準核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも大きくなる蛍光色素1で標識し、更に部位1とは異なった位置にある部位2の塩基を蛍光色素1とは異なった蛍光色素で、且つ内部標準核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量が、標的核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも大きくなる蛍光色素2で標識した二重標識核酸プローブ。

内部標準核酸：上記の二重標識核酸プローブとハイブリダイズしたとき、二重標識核酸プローブに標識した2種の蛍光色素のうち、一方の蛍光色素の蛍光キャラクター変化量が他方の色素と比較して大きくなり、且つ、その蛍光キャラクター変化量が大きい色素は、標的核酸と二重標識核酸プローブがハイブリダイズしたとき蛍光キャラクター変化量が大きい色素とは異なるような塩基配列を有する内部標準核酸。

【請求項 15】

二重標識核酸プローブの蛍光色素標識部位が5'末端と3'末端である請求項12に記載の新規混合物。

【請求項 16】

核酸プローブの2つの部位（末端塩基部、鎖中部、塩基部、糖部、リン酸部を含む。）が、ハイブリダイズすることにより蛍光キャラクター変化の発生する2種類の異なる蛍光色素で標識されている二重標識核酸プローブを含む請求項14、請求項15に記載の新規混合物。

【請求項 17】

核酸プローブの2つの部位を、ハイブリダイズすることにより蛍光強度を減少させるような性質を有する蛍光色素で標識した二重標識核酸プローブを含む請求項14～16に記載の新規混合物。

【請求項 18】

二重標識核酸プローブが、当該核酸プローブの2つC塩基部位を、それぞれハイブリダイズすることにより蛍光キャラクター変化の発生する2種類の異なる蛍光色素で標識されている請求項14～17に記載の新規混合物。

【請求項 19】

二重標識核酸プローブの両末端は、C塩基であり、そのC末端は、ハイブリダイズすることにより蛍光キャラクター変化の発生する2種類の異なる蛍光色素で標識されている請求項14～18の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 20】

二重標識核酸プローブが、当該核酸プローブの2つの部位を、ハイブリダイズすることにより蛍光強度を上昇させるような性質を有する蛍光色素で標識した核酸プローブである請求項14～19の何れか一項に記載の新規混合物。

【請求項 21】

二重標識核酸プローブにおける一方の蛍光色素標識部位の塩基に対応する塩基がグアニン（G）以外であり、他の蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基がGであることを特徴

とする内部標準核酸を含む請求項 1 および請求項 1 2 に記載の新規混合物。

【請求項 2 2】

二重標識核酸プローブの蛍光色素標識塩基に対応する 2 つの塩基のうち、標的核酸が G の場合は、内部標準核酸は G 以外であり、標的核酸が G 以外の場合は、内部標準核酸は G であることを特徴とする請求項 1 および請求項 1 2 に記載の新規混合物。

【請求項 2 3】

請求項 1 ～ 2 0 の何れか一項に記載の複数種若しくは複数対の核酸プローブを含むことを特徴とする複数種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物。

【請求項 2 4】

請求項 1 ～ 2 3 の何れか一項に記載の新規混合物を用いて一種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の複数種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物を用いて複数種の標的核酸の存在比を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法。

【請求項 2 6】

既知濃度の内部標準核酸を反応液に添加して、標的核酸を検出定量する核酸定量手法において、内部標準核酸と標的核酸とを区別せずハイブリダイズするが、ハイブリダイズした核酸が内部標準核酸であるか標的核酸であるかを認識可能な核酸プローブを用いて、標的核酸と内部標準核酸との構成比を求め、本構成比から標的核酸を定量することを特徴とする標的核酸の新規定量方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 で使用する核酸プローブ、内部標準核酸が、請求項 1 ～ 2 0 に記載の標的核酸の新規定量方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 ～ 2 3 の何れか一項に記載の核酸測定のための新規混合物において、一種若しくは複数種の標的核酸存在下でハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の標的核酸プローブ及び内部核酸プローブの蛍光色素に由来する蛍光キャラクター変化を測定し、得られた測定値の比から一種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法。

【請求項 2 9】

請求項 1 ～ 2 0 の何れか一項に記載の核酸プローブからなる一種若しくは一対、または、複数種若しくは複数対の核酸プローブと請求項 1、請求項 1 2、請求項 2 0 および請求項 2 1 に記載の核酸プローブと対応する一種若しくは複数種の内部標準核酸とを含む核酸測定用キット類。

【請求項 3 0】

請求項 1 ～ 2 3 に記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系において、遺伝子増幅方法により一種若しくは複数種の標的核酸、および標的核酸に対応する一種若しくは複数種の内部標準核酸を増幅し、得られた反応液若しくは増幅産物を試料とし、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法。

【請求項 3 1】

請求項 1 ～ 2 3 に記載の内部標準核酸を含む反応系において遺伝子増幅方法により標的核酸を定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅し、得られた反応液若しくは増幅産物を試料として、請求項 1 ～ 2 3 の何れか一項に記載の新規混合物を用いて、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法。

【請求項 3 2】

標的核酸と内部標準核酸とを共通のプライマーで増幅する核酸増幅方法である請求項 3 0 又は 3 1 に記載の一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法。

【請求項 3 3】

プライマーが Q プローブである請求項 3 0 ～ 3 2 に記載の一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法。

【請求項 34】

標的核酸が遺伝子増幅方法で増幅されたものであり請求項 1～23 に記載の新規混合物を用いる核酸の新規測定方法。

【請求項 35】

標的核酸が、遺伝子増幅方法により定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅されたものであり、請求項 1～23 に記載の新規混合物を用いる核酸の新規測定方法。

【請求項 36】

標的核酸および内部標準核酸が遺伝子増幅方法で増幅されたものであり、請求項 1～23 に記載の新規混合物を用いる核酸の新規測定方法。

【請求項 37】

標的核酸および内部標準核酸が、遺伝子増幅方法により定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅されたものであり、請求項 1～23 に記載の新規混合物を用いる核酸の新規測定方法。

【請求項 38】

標的核酸と内部標準核酸が、同一のプライマーにより増幅されたものであり、請求項 1～23 に記載の新規混合物を用いる核酸の新規測定方法。

【請求項 39】

下記のタイプの核酸プローブと下記のタイプの内部標準核酸との対を一種若しくは複数対を含むことを特徴とする、 T_m 値測定に基づく一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

核酸プローブ：蛍光色素で標識された一本鎖の核酸プローブで、且つ標的核酸及び内部標準核酸にハイブリダイズできる核酸プローブで、標的核酸及び内部標準核酸にハイブリダイズしたときに、標識された蛍光色素の蛍光キャラクターが変化する核酸プローブ。複数種の核酸プローブの場合、各プローブの蛍光色素が異なる。

内部標準核酸：上記核酸プローブが標的核酸とハイブリダイズする部位の塩基配列と、内部標準核酸とハイブリダイズする部位との塩基配列が一部異なることを特徴とする内部標準核酸。

【請求項 40】

核酸プローブが、一種の蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドである請求項 39 に記載の T_m 値測定に基づく一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

【請求項 41】

核酸プローブが、シトシン部位が一種の蛍光色素で標識された一本鎖のオリゴヌクレオチドである請求項 39 に記載の T_m 値測定に基づく一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

【請求項 42】

核酸プローブが Q プローブである請求項 39 に記載の T_m 値測定に基づく一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

【請求項 43】

核酸プローブが、一種の蛍光色素で標識された一本鎖のオリゴヌクレオチドであり、ハイブリダイゼーションにより蛍光強度が増加するオリゴヌクレオチドである請求項 38 に記載の T_m 値測定に基づく一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

【請求項 44】

請求項 39～43 に記載の T_m 値測定に基づく標的核酸を測定するための新規混合物に、一種若しくは複数種の標的核酸存在下で、温度を変化させながら、反応液の蛍光強度を測定した後、下記の手順により、標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法。

手順：

- 1) 測定された蛍光強度変化のカーブを描く。
- 2) 当該カーブを微分する。
- 3) 各ピークを積分してピークの面積を求める。

- 4) 内部標準核酸のピーク面積と標的核酸のピーク面積比を求める。
5) 当該比と内部標準核酸の濃度を乗ずる。

【請求項 45】

標的核酸が、請求項 39～43 に記載の内部標準核酸を含む反応液内で遺伝子増幅方法により増幅されたものである新規核酸測定方法。

【請求項 46】

プライマーが Q プローブである請求項 45 に記載の核酸の新規測定方法。

【請求項 47】

請求項 39～43 に記載の核酸プローブ及び内部標準核酸を含む核酸測定キット類。

【請求項 48】

請求項 1～21 および請求項 40～43 の何れか一項に記載の核酸プローブからなる一種若しくは一対、または、複数種若しくは複数対の核酸プローブ。

【請求項 49】

請求項 1～48 何れか一項の反応液あるいは核酸測定法を利用する装置。

【請求項 50】

請求項 1～49 何れか一項の反応液あるいは核酸測定法を利用した標準キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸測定用新規混合物、及びそれを用いる核酸の新規測定方法並びにそれらに用いる核酸プローブ

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的核酸の新規測定方法用の新規混合物に関する。詳しくは、1種若しくは複数種の標的核酸を、正確、簡便に且つ安価に測定するための新規混合物、及びそれを用いた標的核酸の測定方法、並びにそれらに用いられる核酸プローブ及び測定キット類に関する。

【背景技術】

【0002】

標的核酸測定方法の多くの例は、標的核酸とハイブリダイズすることで蛍光が変化する性質を有する蛍光色素標識核酸プローブ（均一溶液系プローブ）を用いて、均一系で測定が行われる方法である。当該方法は、本特徴により、一般的にハイブリダイゼーション方法で不可欠な工程であった1) 標的核酸の固定化工程（或いはプローブの固定化工程）、2) 未反応プローブの洗浄工程（或いは未反応遺伝子の固定化工程）が不要となるため、簡便、迅速且つ正確な方法である。このため、当該標的核酸定量法は、様々な遺伝子解析手法に汎用されている（非特許文献1参照。）。

【0003】

均一溶液系プローブを用いて直接標的核酸を測定する場合、まず、予め用意した既知濃度の標的核酸と、均一溶液系プローブとをハイブリダイゼーションさせ、その際の光学的キャラクターの変化若しくは変化量をモニタリングしておく。当該変化若しくは変化量は、標的核酸量と正比例の関係にあるため、この関係式を作製すると、標的核酸の検量線となる。未知試料についても上記と同様の操作を実施し、得られた光学的キャラクターの変化若しくは変化量から、当該検量線から標的核酸量を定量する事が可能となる。

【0004】

しかしながら、当該方法では、検量線作成の際に添加したプローブ濃度以上に標的核酸が存在した場合、光学的キャラクターの変化若しくは変化量は常に一定となる。このため、既存の測定法では、1) 標的核酸を希釈する、2) プローブ濃度を変化させた系を複数系列用意するという手段の内、どちらかを講じる必要がある。1) の対策を講じた場合、希釈工程が必要となるため、操作が煩雑となり、1) 分析に時間がかかる、2) 希釈による誤差が生じる、3) 分析を自動化する際は、希釈のための装置が必要、といった問題が生じる。また、2) の対策を講じた場合は、添加したプローブ濃度によってハイブリダイゼーションに最適な反応時間、反応温度が異なるため（標的核酸濃度とプローブ濃度の高濃度で存在すれば、ハイブリダイゼーションが完了する時間は短なり、その逆の場合は、反応時間は長くなる。また、 T_m 値に関しては、標的核酸濃度とプローブ濃度の高濃度で存在すれば、高くなり、その逆の場合は、低くなる。）、1) プローブ濃度毎に、実験系を最適化する必要がある、2) 添加したプローブ濃度毎に検量線を用意する必要がある、といった問題点が存在する。

【0005】

【非特許文献1】蛋白質・核酸・酵素；35巻、17号、1990年、共立出版株式会社；実験医学、15巻、7号、1997年、羊土社

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、前記の状況に鑑み、均一系核酸プローブを用いる方法において、1) 標的核酸の希釈工程が不要、2) プローブの濃度を変化させることが不要、といった特徴を有する核酸測定方法を可能とする標的核酸測定用の新規混合物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、前記課題を解決するにあたり、以下のような種々の検討を行い、次の知見を得て本発明を完成した。即ち、既知濃度の特定の内部標準核酸、均一系の蛍光色素で標識された特定の標的核酸プローブ及び前記の内部標準核酸にハイブリダイズし、蛍光色素で標識された特定の内部標準核酸プローブを含む反応液（ハイブリダイゼーション反応系）に標的核酸を添加し、ハイブリダイゼーション反応を行わせ、発生する光学的キャラクターの変化を測定する。そして、内部標準核酸と標的核酸との測定値の比を求めることにより、本発明の課題は達成できる。

【0008】

すなわち、本発明は、

1) 下記のタイプ的一种若しくは複数種の標的核酸プローブ、当該核酸プローブと同数種の下記のタイプの内部標準核酸並びに当該内部標準核酸と同数種の下記のタイプの内部標準核酸プローブを含むことを特徴とする一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための核酸測定用新規混合物（以下単に新規混合物という。）、又、

【0009】

標的核酸プローブ：標的核酸、内部標準核酸の両方にハイブリダイズするが、内部標準核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも、標的核酸とハイブリダイズしたときのみ蛍光キャラクター変化量が大きいという特徴を有する蛍光色素で標識した核酸プローブ。

内部標準核酸プローブ：標的核酸、内部標準核酸の両方にハイブリダイズするが、標的核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも、内部標準核酸とハイブリダイズしたときのみ蛍光キャラクター変化量が大きいという特徴を有する蛍光色素で標識した核酸プローブ。

内部標準核酸：前記の標的核酸プローブ及び内部標準核酸プローブが当該内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、標的核酸プローブの蛍光キャラクター変化量よりも、内部標準核酸プローブの蛍光キャラクター変化量が大きくなるような塩基配列を有する内部標準核酸。

【0010】

2) 標的核酸プローブ及び内部標準核酸プローブが以下のタイプのものである前記1)に記載の核酸測定用新規混合物、又、

標的核酸プローブ：1本鎖のオリゴヌクレオチドの1部位（末端塩基部、鎖中部を含む。以下同じ意味を有する。）の塩基シトシン（C）又はグアニン（G）部位（塩基部、糖部、リン酸部を含む。以下同じ意味を有する。）を、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素で標識した核酸プローブ。

【0011】

内部標準核酸プローブ：一本鎖のオリゴヌクレオチドで、前記標的核酸プローブとは異なった部位の塩基C又はG部位を、標的核酸プローブに用いられた蛍光色素とは異なる光学的キャラクターを有する蛍光色素で標識した核酸プローブで、内部標準核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する。

【0012】

内部標準核酸：標的核酸プローブにおける蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基、又は当該塩基（0と数える。）から1乃至2塩基離れて、G又はC以外のものが存在し、且つ、内部標準核酸プローブにおける蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基が、又は当該塩基（0と数える。）から1乃至2塩基離れてG又はCが存在する（好適には、内部標準核酸プローブの蛍光色素の標識部位の塩基がCの場合はGが、又Gの場合はCが存在する。）。

【0013】

3) 標的核酸プローブと内部標準プローブの塩基配列の鎖長が同じである前記1)又は2)に記載の核酸測定用新規混合物、又、

4) 標的核酸プローブと内部標準プローブの塩基配列が同じである前記1)～3)に記載の一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための核酸測定用新規混合物、又、

5) 内部標準プローブの蛍光色素の標識部位の塩基に対応する標的核酸の塩基がG以外のものである前記1)～4)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

【0014】

6) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が5'末端である前記1)～5)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。

7) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が3'末端である前記1)～6)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

8) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が5'末端で、内部標準プローブの蛍光色素標識部位が3'末端である前記1)～7)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

9) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が3'末端である前記1)～8)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

10) 内部標準プローブの蛍光色素標識部位が5'末端である前記1)～9)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

11) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が3'末端で、内部標準プローブの蛍光色素標識部位が5'末端である前記1)～10)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

【0015】

12) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブがQプローブである前記1)～11)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

13) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブがQプローブである前記1)～11)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物、又、

14) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブが、1本鎖のオリゴヌクレオチドの1つの部位を、ハイブリダイズした際に、蛍光強度を上昇させるような性質を有する蛍光色素で標識した核酸プローブである前記1)～13)の何れか一項に記載の新規反応液、又、

【0016】

15) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブが、それぞれ蛍光キャラクターの異なる少なくとも1種の色素で標識した核酸プローブである前記1)～14)の何れか一項に記載の新規反応液、又、

16) 標的核酸プローブと内部標準プローブの対が複数対の核酸プローブを含む新規混合物の場合は、対間の蛍光色素対も異なる前記1)～15)の何れか一項に記載の新規反応液、又、

17) 前記1)～16)の何れか一項に記載の新規混合物を用いて1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

18) 前記1)～16)の何れか一項に記載の核酸測定のための新規混合物に1種若しくは複数種の標的核酸を加えてハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の標的核酸プローブ及び内部核酸プローブの蛍光色素に由来する光学的キャラクター変化を各々測定し、各蛍光色素についての得られた測定値の比から1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

【0017】

17) 前記1)～16)の何れか一項に記載の標的プローブ及び内部標準プローブからなる一対若しくは複数対の核酸プローブ、又、

18) 前記1)～16)の何れか一項に記載の標的プローブ及び内部標準核酸プローブからなる一対若しくは複数対の核酸プローブと前記1)に記載の、当該核酸プローブ対と対応する1種若しくは複数種の内部標準核酸とを含む核酸測定用キット類、又、

【0018】

19) 前記1)～16)の何れか一項に記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸、及び当該内部標準核酸に対応する一種若しくは複数種の標的核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により増幅し、得られた反応液又は増幅物を測定試料として、一種若しくは複数種の

増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規核酸測定方法、又は、

【0019】

20) 前記1)～16)に記載の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により標的核酸を定常期に到るまで(定常期を含む。)増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、前記1)～8)の何れか一項に記載の新規混合物を用いて、1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

21) 標的核酸のプライマーと内部標準核酸のプライマーとして同じものを用いた核酸増幅方法である前記19)又は20)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の核酸を測定する方法、又、

【0020】

22) 標的核酸のプライマー及び/又は内部標準核酸のプライマーがQプローブである前記19)～21)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法、又、

23) 下記のタイプの標的核酸プローブと下記のタイプの内部標準核酸との対を1種若しくは複数種の対を含むことを特徴とする、 T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

【0021】

標的核酸プローブ：1本鎖の蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドからなる核酸プローブで、且つ標的核酸及び内部標準核酸にハイブリダイズできる標的核酸プローブで、標的核酸及び内部標準核酸にハイブリダイズしたときに、標識された蛍光色素の光学的キャラクターが変化する標的核酸プローブ。複数種の核酸プローブの場合、各プローブの蛍光色素が異なる。

【0022】

内部標準核酸：上記核酸プローブが標的核酸とハイブリダイズする部位の塩基配列と、内部標準核酸とハイブリダイズする部位との塩基配列が一部異なる。
核酸プローブの蛍光色素標識部位の塩基配列は標的核酸と同じであるが、それ以外の部位の塩基配列の1部が異なった配列を有する。

【0023】

24) 核酸プローブの蛍光色素標識部位が塩基C部位である前記23)に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物、又は、

25) 一種の蛍光色素で標識された核酸プローブである前記23)又は24)に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物、又は、

【0024】

26) 核酸プローブがQプローブである前記23)～25)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物、又は、

27) 核酸プローブが、標的核酸及び/又は内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、光学的変化が増加するものである前記前記23)～26)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物、又は、

28) 核酸プローブが前記1)～16)と同じである前記前記23)～27)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物、又は、

【0025】

29) 前記23)～28)に記載の T_m 値測定に基づく標的核酸を測定するための新規混合物を用いて標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又は、

30) 前記23)～28)に記載の T_m 値測定に基づく標的核酸を測定するための新規混合物に、1種若しくは複数種の標的核酸を加え、ハイブリダイゼーション反応を行った後、反応液の温度を徐々に上げながら、反応液の蛍光強度を測定した後、下記の手順により、標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又は、

【0026】

手順：

- (1) 測定された光学的キャラクターの変化のカーブを描く。
- (2) 当該カーブを微分する。
- (3) 得られた各ピークの高さを測定する。又は各ピークを積分してピークの面積を求める。
- (4) 内部標準核酸のピークの高さ又はピーク面積に対する標的核酸のピークの高さ又はピーク面積の比（標的核酸の高さ／内部標準核酸の高さ、又は標的核酸の面積／内部標準核酸の面積）を求める。
- (5) 当該比と内部標準核酸の濃度を乗ずる。

【0027】

31) 前記23)～28)に記載の核酸プローブ及び内部標準核酸を含む核酸測定キット類、

32) 前記23)～28)の何れか一項に記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸、及び当該内部標準核酸に対応する一種若しくは複数種の標的核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により増幅し、得られた反応液又は増幅物を測定試料として、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規核酸測定方法、又は、

【0028】

33) 前記23)～28)の何れか一項に記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸、及び当該内部標準核酸に対応する一種若しくは複数種の標的核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅し、得られた反応液又は増幅物を測定試料として、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規核酸測定方法、又は、

34) 核酸測定方法が、前記29)又は30)に記載の新規核酸測定方法である前記32)又は33)に記載の標的核酸の新規核酸測定方法、又は、

35) 標的核酸と内部標準核酸のプライマーとして同じものを用いた遺伝子増幅方法である前記32)～34)の何れか一項に記載の新規核酸測定方法、又、

【0029】

36) 標的核酸及び／又は内部標準核酸のプライマーがQプローブである前記32)～35)の何れか一項に記載の核酸の新規測定方法、又、

37) 前記23)～28)に記載の内部標準核酸を含む核酸増幅用試薬キット類、又、

【0030】

38) 下記タイプの内部標準核酸と下記タイプの二重標識核酸プローブの一对の一種若しくは複数種を含むことを特徴とする一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規反応液（以下単に新規反応液という。）、又は、

【0031】

二重標識核酸プローブ：1本鎖のオリゴヌクレオチドの部位1（末端塩基部、鎖中部を含む。）を、標的核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量が、内部標準核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも大きくなる蛍光色素1で標識し、更に部位1とは異なった位置にある部位2の塩基を蛍光色素1とは異なった蛍光色素で、且つ内部標準核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量が、標的核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも大きくなる蛍光色素2で標識した二重標識核酸プローブ。

【0032】

内部標準核酸：上記の二重標識核酸プローブとハイブリダイズしたとき、二重標識核酸プローブに標識した2種の蛍光色素のうち、一方の蛍光色素の蛍光キャラクター変化量が他方の色素と比較して大きくなり、且つ、その蛍光キャラクター変化量が大きい色素は、標的核酸と二重標識核酸プローブがハイブリダイズしたとき蛍光キャラクター変化量が大きい色素とは異なるような塩基配列を有する内部標準核酸。

【0033】

39) 内部標準核酸と二重標識核酸プローブが下記のタイプのものである前記38)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

【0034】

二重標識核酸プローブ: 1本鎖のオリゴヌクレオチドの部位1(末端塩基部、鎖中部を含む。)の塩基シトシン(C)部位(塩基部、糖部、リン酸部を含む。)を、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素1で標識し、更に部位1とは異なった位置にあり、且つ対応する標的核酸の塩基がG以外のものである部位2の塩基をCに替えたC部位(塩基部、糖部、リン酸部を含む。)を、蛍光色素1とは異なった蛍光色素で、且つ標識部位の塩基に対応する標的核酸がGの場合、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素2で標識した二重標識核酸プローブ。

【0035】

内部標準核酸: 前記二重標識核酸プローブにおける一つの蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基がグアニン(G)以外のものであり、他の蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基がGである。

【0036】

40) 二重標識核酸プローブの蛍光色素標識部位が5'末端と3'末端である前記38)又は39)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

41) 二重標識核酸プローブが核酸プローブの2つの部位(末端塩基部、鎖中部、塩基部、糖部、リン酸部を含む。)が、ハイブリダイズすることにより蛍光キャラクター変化の発生する2種類の異なる蛍光色素で標識されているものである前記38)～40)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

【0037】

42) 二重標識核酸プローブの2つの部位を、ハイブリダイズすることにより蛍光強度を減少させるような性質を有する蛍光色素で標識した二重標識核酸プローブである前記38)～41)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

43) 二重標識核酸プローブが、当該核酸プローブの2つC塩基部位を、それぞれハイブリダイズすることにより蛍光キャラクター変化の発生する2種類の異なる蛍光色素で標識されているものである前記38)～42)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

【0038】

44) 二重標識核酸プローブの両末端は、C塩基であり、そのC末端は、ハイブリダイズすることにより蛍光キャラクター変化の発生する2種類の異なる蛍光色素で標識されている前記38)～43)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

45) 二重標識核酸プローブが、当該核酸プローブの2つの部位を、ハイブリダイズすることにより蛍光強度を上昇させるような性質を有する蛍光色素で標識されているものである前記38)～44)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

【0039】

46) 二重標識核酸プローブにおける一方の蛍光色素標識部位の塩基に対応する塩基がグアニン(G)以外であり、他の蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基がGであることを特徴とする内部標準核酸を含む前記38)～45)に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

【0040】

47) 二重標識核酸プローブの蛍光色素標識塩基に対応する2つの塩基のうち、標的核酸がGの場合は、内部標準核酸はG以外であり、標的核酸がG以外の場合は、内部標準核酸はGである前記38)～43)、46)の何れか一項に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

【0041】

48) 二重標識核酸プローブがQプローブである前記38)～43)、46)、47)の何れか一項に記載の標的核酸測定用新規混合物、又、

49) 前記38)～48)に記載の新規混合物を用いて1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

【0042】

50) 前記38)～48)に記載の新規混合物に1種若しくは複数種の標的核酸を加えてハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の蛍光色素に由来する光学的キャラクター変化を測定し、得られた測定値の比から1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

【0043】

51) 前記38)～48)の何れか一項に記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸、及び当該内部標準核酸に対応する一種若しくは複数種の標的核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により増幅し、得られた反応液又は増幅物を測定試料として、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規核酸測定方法、又は、

52) 前記38)～48)の何れか一項に記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸、及び当該内部標準核酸に対応する一種若しくは複数種の標的核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により定常期に到るまで(定常期を含む。)増幅し、得られた反応液又は増幅物を測定試料として、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規核酸測定方法、又は、

53) 核酸測定方法が、前記49)に記載の新規核酸測定方法である前記51)又は52)に記載の標的核酸の新規核酸測定方法、又は、

54) 標的核酸と内部標準核酸のプライマーとして同じものを用いた遺伝子増幅方法である前記51)～53)の何れか一項に記載の新規核酸測定方法、又、

【0044】

55) 標的核酸及び/又は内部標準核酸のプライマーがQプローブである前記51)～54)の何れか一項に記載の核酸の新規測定方法、又、

56) 前記38)～48)に記載の内部標準核酸を含む核酸増幅用試薬キット類、又、

57) 前記32)の記載の2重標識核酸プローブ及び前記32)の記載の内部標準核酸とを含むことを特徴とする核酸測定用キット類、又、

58) 前記32)又は33)に記載の2重標識核酸プローブ、

【0045】

59) 既知濃度の内部標準核酸を反応液に添加して、標的核酸を検出定量する核酸定量手法において、内部標準核酸と標的核酸とを区別せずハイブリダイズするが、ハイブリダイズした核酸が内部標準核酸であるか標的核酸であるかを認識可能な核酸プローブを用いて、標的核酸と内部標準核酸との構成比を求め、本構成比から標的核酸を定量することを特徴とする標的核酸の新規定量方法、又、

【0046】

60) 前記59)で使用する核酸プローブ、内部標準核酸が、前記1)～58)に記載の標的核酸の新規定量方法、又、

61) 前記1)～58)の何れか一項に記載の核酸測定のための新規反応液において、一種若しくは複数種の標的核酸存在下でハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の標的核酸プローブ及び内部核酸プローブの蛍光色素に由来する蛍光キャラクター変化を測定し、得られた測定値の比から一種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

【0047】

62) 前記1)～58)の何れか一項に記載の核酸プローブからなる一種若しくは一対、または、複数種若しくは複数対の核酸プローブと当該核酸プローブと対応する一種若しくは複数種の内部標準核酸とを含む核酸測定用キット類、又、

【0048】

63) 前記1)～58)に記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系において、遺伝子増幅方法により一種若しくは複数種の標的核酸、および標的核酸に対応する一種若しくは複数種の内部標準核酸を増幅し、得られた反応液若しくは増幅産物を試料とし、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法、又、

【0049】

64) 前記1)～58)に記載の内部標準核酸を含む反応系において遺伝子増幅方法に

より標的核酸を定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅し、得られた反応液若しくは増幅産物を試料として、前記 1）～58）の何れか一項に記載の新規反応液を用いて、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法、又、

【0050】

65) 標的核酸と内部標準核酸とを共通のプライマーで増幅する核酸増幅方法である前記 63) 又は 64) に記載の一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法、又、

66) プライマーが Q プロブである前記 63) ～65) に記載の一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法。

【0051】

67) 標的核酸が遺伝子増幅方法で増幅されたものであり前記 1) ～58) に記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

68) 標的核酸が、遺伝子増幅方法により定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅されたものであり、前記 1) ～58) に記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

【0052】

69) 標的核酸および内部標準核酸が遺伝子増幅方法で増幅されたものであり、前記 1) ～58) に記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

70) 標的核酸および内部標準核酸が、遺伝子増幅方法により定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅されたものであり、前記 1) ～58) に記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

【0053】

71) 標的核酸と内部標準核酸が、同一のプライマーにより増幅されたものであり、前記 1) ～58) に記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

【0054】

72) 下記の複数種の核酸プローブを含むことを特徴とする複数種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物、又、

{核酸プローブ：1本鎖のオリゴヌクレオチドの 1 部位（末端塩基部、鎖中部を含む。）で、且つ他の核酸プローブの部位とは異なった部位の塩基シトシン（C）部位（塩基部位、糖部位、リン酸部位を含む。）を、対応する標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素で、且つ他の核酸プローブの蛍光色素とは異なった蛍光色素で標識した核酸プローブ。}、

【0055】

73) 前記 72) に記載の複数種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物を用いて複数種の標的核酸の存在比を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

74) 前記 72) に記載の複数種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物に、複数種の標的核酸を加え、ハイブリダイゼーション反応を行い、各核酸プローブの蛍光色素の光学的キャラクター変化を測定し、得られた測定値の比から複数種の標的核酸の存在比を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

【0056】

75) 標的核酸が遺伝子増幅方法で増幅されたものである前記 73) 又は 74) に記載の核酸の新規測定方法、又、

76) 標的核酸が、遺伝子増幅方法により標的核酸を定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅し、得た反応液若しくは増幅産物である前記 73) 又は 74) に記載の核酸の新規測定方法、又、

【0057】

77) 標的核酸と内部標準核酸のプライマーとして同じものを用いた核酸増幅方法である前記 73) 又は 74) に記載の核酸の新規測定方法、又、

78) 核酸プローブが Q プロブである前記 72) ～77) に記載の核酸の新規測定方法

を提供する。

【発明の効果】

【0058】

上記のような本発明の新規混合物を用いることにより、以下のような特徴を有する新規核酸測定方法が出来るようになった。即ち当該方法による標的核酸の測定において、1) 標的核酸の希釈工程が不要、2) 使用するプローブの濃度を、標的核酸濃度に応じて変えることが不要、3) 同一測定系で複数の標的核酸を測定できる、4) 測定感度が向上した、5) 核酸増幅方法と本発明の核酸測定方法を合体することにより、

(1) 遺伝子増幅反応終了後(エンドポイントで)、反応チューブを開放することなく、迅速且つ簡便に測定することができるので、ポストPCR工程が必要なく簡便・迅速に標的核酸の測定ができる、(2) 反応チューブを解放する必要性が無く、増幅産物によるコインタミの心配がない、(3) 競合法であるため阻害物質の影響を受けにくい、(4) 遺伝子増幅と増幅産物の検出とを完全に分離できるため、大量サンプルの処理が可能となり、サンプル処理能力を、簡便且つ安価に向上させる事が可能(例えば、蛍光測定機能を持たない安価なPCR装置を、複数台用いて遺伝子増幅した後、蛍光測定装置にて順次解析することで、例え蛍光測定装置が一台であっても大量サンプルの処理が可能となる)、(5) 増幅の過程をリアルタイムモニタリングする必要性が無く、PCR反応に不可欠なサーマルサイ클ラーとしての機能が不要となるため、非常に簡便かつ安価な測定装置で核酸測定が可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0059】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明を更に詳細に説明する前に本発明で使用する用語を説明又は定義する。本発明において用いる用語は、特別な定義がない場合は、現在、分子生物学、遺伝学若しくは遺伝子工学、微生物学若しくは微生物工学等で一般的に使用されている用語と同じ意味である。

【0060】

「1種若しくは複数種」とは、少なくとも1種の意味である。

「標的核酸」とは、検出・測定を目的とした核酸の意味である。

「核酸」、「標的核酸」、「内部標準核酸」には遺伝子も含まれるものとする。そして、本明細書においては一般的な場合は「標的核酸」、「内部標準核酸」又は単に「核酸」なる用語を使用し、具体的な場合は「標的遺伝子」、「内部標準遺伝子」又は単に「遺伝子」なる用語を使用した。

「試料中に含まれる核酸」のことを単に標的核酸又は目的核酸という場合がある。

【0061】

本発明において「核酸を測定する」、或いは「核酸濃度を測定する」なる用語は、標的核酸の濃度を定量することは勿論のこと、定量的検出をすること、定性的検出をすること、核酸増幅系の蛍光強度を単に測定するか若しくは単にモニタリングすること等を意味するものとする。又、このようにして得られたデータを公知の蔵田らの方法(EP特許公開公報、EP1 046 717 A9号)で解析して、1つの系内に存在している濃度(コピー数等)を求める操作等も含めるものとする。

【0062】

上記の理由で、本発明の「試料に含まれる核酸」とは、検出・測定を目的とした特定の核酸とは限らず、意図せずとも本発明の方法により検出され得る不特定の核酸をも含むものとする。勿論遺伝子等を含む。それらの核酸が混在していてもよい。濃度の大小も問わない。核酸はDNA、RNA及びそれらの修飾物を含むものである。

【0063】

「光学的キャラクター」なる用語は、核酸プローブを標識する蛍光物質、クエンチャー物質等の各種の吸収スペクトル、若しくは蛍光発光スペクトル、及びそれらの吸収強度、偏光、蛍光発光、蛍光強度、蛍光寿命、蛍光偏光、蛍光異方性等の光学的特性等のことを

いう（「蛍光強度」、単に「蛍光」で総称する場合がある。）。又、核酸プローブ等に標識されている少なくとも1つの蛍光物質等について少なくとも1種以上の測定波長で測定された測定値を総合的に評価して得た性質のこともいう。例えば、核酸の変性反応の蛍光強度曲線等もその1つである。

又、一般的な場合は、「光学的キャラクター」なる用語を使用し、具体的な場合は、「蛍光強度」、単に「蛍光」なる用語を使用した。

【0064】

本発明において、「光学的キャラクターの変化量」、「蛍光強度変化量」、「蛍光変化量」なる用語は、本発明の増幅核酸に基づく蛍光強度の変化だけでなく、当該増幅核酸に、蛍光物質及び／又はクエンチャーで標識された均一溶液系核酸プローブをハイブリダイズさせたときの、そのハイブリダイゼーション前後の蛍光強度の変化若しくは変化量をも含めるものとする。

【0065】

本発明においては、プライマープローブと対応核酸とのハイブリダイゼーションによるプライマープローブと核酸の複合体のことをハイブリッド、またはハイブリッド複合体、または単に、核酸・プライマー複合体またはプライマー・核酸複合体という。

【0066】

本発明でいう蛍光色素（蛍光物質という場合もある。）とは、一般に核酸プローブに標識して、核酸の測定・検出に用いられている蛍光物質の類である。例えば、フルオレセイン（fluorescein）又はその誘導体類（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate）（FITC）若しくはその誘導体等、Alexa 488、Alexa 532、cy3、cy5、6-joe、EDANS、ローダミン（rhodamine）6G（R6G）又はその誘導体（例えば、テトラメチルローダミン（tetramethylrhodamine）（TMR）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（tetramethylrhodamine isothiocyanate）（TMRITC）、x-ローダミン（x-rhodamine）、テキサスレッド（Texas red）、ボデピー（BODIPY）（商標名）FL（商品名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国；BODIPYについては以下同様である。）、ボデピー（BODIPY）FL/C3、ボデピー（BODIPY）FL/C6、ボデピー（BODIPY）5-FAM、ボデピー（BODIPY）TMR又はその誘導体（例えば、ボデピー（BODIPY）TR、ボデピー（BODIPY）R6G、ボデピー（BODIPY）564、ボデピー（BODIPY）581、タムラー（TAMRA）等を挙げることができる。

【0067】

上記の中でも、TAMRA、FITC、EDANS、テキサスレッド、6-joe、TMR、Alexa 488、Alexa 532、ボデピー（BODIPY）FL/C3、ボデピー（BODIPY）R6G、ボデピー（BODIPY）FL、Alexa 532、ボデピー（BODIPY）FL/C6、ボデピー（BODIPY）TMR、5-FAM、ボデピー（BODIPY）493/503、ボデピー（BODIPY）564、ボデピー（BODIPY）581、Cy3、Cy5、x-Rhodamine等を好適なものとして挙げるができる。

クエンチャー物質とは、前記蛍光物質に作用して、その発光を抑制もしくは消光する物質である。例えば、Dabcyl、QSY7（モレキュラー・プローブ）、QSY33（モレキュラー・プローブ）、Ferroceneまたはその誘導体、methyl viologen、N,N'-dimethyl-2,9-diazopyreniumなど、好適にはDabcylなどを挙げるができる。

前記のような、蛍光物質およびクエンチャー物質を、オリゴヌクレオチドの特定の位置に標識することにより、蛍光物質の発光は、クエンチャー物質によりクエンチング効果を受ける。

【0068】

核酸増幅方法は、本発明の目的を達成出来ればどのような方法でもよい。

本発明でいう核酸増幅方法とは、インビトロ（in vitro）で核酸を増幅する方法のことをいう。公知、未公知を問わない。例えば、PCR方法、LCR方法（ligase chain reaction）、TAS方法、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）方法、LAMP方法、NASRA方法、RCA方法、TAMA方法、UCAN方法等を全て含めるものとする。好適にはプライマープローブ又は単なるプローブを用いるPCR方法で行うの

が好適である。

【0069】

前記PCR方法はどのような形式のものでも好適に採用できる。例えば、定量的PCR方法、リアルタイムモニタリング定量的PCR方法、RT-PCR、RNA-primed PCR、Stretch PCR、逆PCR、Alu配列を利用したPCR、多重PCR、混合プライマープローブを用いたPCR、PNAを用いたPCR、PCRにより増幅した核酸について、融解曲線の解析若しくは分析する方法等をも含むものとする。

【0070】

”Qプローブ”又は”QProbe”とは、KURATAらにより開発されたプローブ（KURATA et al., Nucleic acids Research, 2001, vol. 29, No. 6 e34）である。このプローブは、1本鎖のオリゴヌクレオチドを蛍光色素で標識した均一溶液系核酸プローブであるが、蛍光色素で標識した部位の塩基がG又はCであるか、又は対応核酸の標識塩基に対応する塩基から1乃至3塩基離れて（標識塩基に対応する塩基を1と数える。）G又はCが存在する均一溶液系核酸プローブである。

【0071】

蛍光色素のオリゴヌクレオチドの標識部位は、末端部、鎖中でも良い。好ましくは、5'又は3'末端側部、より好ましくは5'又は3'末端部、最良は5'又は3'末端である。標識位置は糖部位、リン酸部位、塩基部位どちらでもよい。

【0072】

本発明は4つの発明からなる。そして、第1発明は更に1つの副発明を含む。第2発明は更に2つの副発明を有する。

以下に記載の新規混合物は、液体状のもの、粉末状のもの、錠剤状のもの、カプセル状のものどちらでも好適に採用でき、特に限定されない。それで、以下の記載においては、新規混合物の形態を特別に記載していない。

【0073】

又、以下に記載の標的核酸、内部標準遺伝子は核酸増幅方法で、任意の増幅時期（定常期を含む。）まで増幅された増幅物も含まれるものとする。又、標的核酸は、それに対応する内部標準核酸と一緒に一つの系で同時に増幅されたもの、その増幅反応液、又、その増幅反応液から標的核酸が内部標準核酸と一緒に且つ同時に分離されたものも含まれるものとする。この場合、同じプライマーを使用してもよいし、しなくともよい。核酸増幅方法は下記に示した通常のものである。

【0074】

本発明で使用する核酸プローブ（標的核酸プローブ及び／又は内部標準核酸プローブ）は対応する核酸（標的核酸、内部標準核酸）にハイブリダイズしたとき、光学的キャラクターが変化するものであるが、蛍光強度が減少するもの及び増加するものを例示できる。例えば、蛍光強度が減少するものとして前記したQプローブ（QProbe）、蛍光強度が増加するものとしてFRET現象に関係する2つの色素で標識された核酸プローブ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. pp8790-8794, 1988; USA特許No. 4, 996, 143; 日本特許公表公報（A）平5-50152号; 日本特許公開公報（A）平8-313529号; 日本特許公開公報（A）平10-215897号; 特願平11-292861）等を一例として示される。

【0075】

A) 第1発明

1種若しくは複数種の内部標準核酸並びに1種若しくは複数種の標的核酸プローブ及び1種若しくは複数種の内部標準核酸プローブを含む新規混合物に係る発明である。即ち、1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための核酸測定用新規混合物（以下単に新規混合物という。）とそれを用いる核酸の新規測定方法である。

【0076】

a) 新規混合物

即ち、下記の新規混合物である。

1) 下記のタイプの一つ若しくは複数種の標的核酸プローブ、当該核酸プローブと同数

種の下記のタイプの内部標準核酸並びに当該内部標準核酸と同数種の下記のタイプの内部標準核酸プローブを含むことを特徴とする一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための核酸測定用新規混合物（以下単に新規混合物という。）。

【0077】

標的核酸プローブ：標的核酸、内部標準核酸の両方にハイブリダイズするが、内部標準核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも、標的核酸とハイブリダイズしたときのみ蛍光キャラクター変化量が大きいという特徴を有する蛍光色素で標識した核酸プローブ。

内部標準核酸プローブ：標的核酸、内部標準核酸の両方にハイブリダイズするが、標的核酸とハイブリダイズしたときの蛍光キャラクター変化量よりも、内部標準核酸とハイブリダイズしたときのみ蛍光キャラクター変化量が大きいという特徴を有する蛍光色素で標識した核酸プローブ。

【0078】

内部標準核酸：前記の標的核酸プローブ及び内部標準核酸プローブが当該内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、標的核酸プローブの蛍光キャラクター変化量よりも、内部標準核酸プローブの蛍光キャラクター変化量が大きくなるような塩基配列を有する内部標準核酸。

【0079】

本発明においては、以下の場合が好適である。

2) 前記1)に記載の標的核酸プローブ及び内部標準核酸プローブが以下のタイプのものでの核酸測定用新規混合物。

標的核酸プローブ：1本鎖のオリゴヌクレオチドの1部位（末端塩基部、鎖中部を含む。以下同じ意味を有する。）の塩基（塩基部、糖部、リン酸部を含む。以下同じ意味を有する。）を、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素で標識した核酸プローブ。好適には前記塩基部位はDシトシン（C）又はグアニン（G）部位である。

【0080】

内部標準核酸プローブ：一本鎖のオリゴヌクレオチドで、前記標的核酸プローブとは異なった部位の塩基C又はG部位を、標的核酸プローブに用いられた蛍光色素とは異なる光学的キャラクターを有する蛍光色素で標識した核酸プローブで、内部標準核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する。

【0081】

内部標準核酸：標的核酸プローブにおける蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基、又は当該塩基（0と数える。）から1乃至2塩基離れて、G又はC以外のものが存在し、且つ、内部標準核酸プローブにおける蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基が、又は当該塩基（0と数える。）から1乃至2塩基離れてG又はCが存在する（好適には、内部標準核酸プローブの蛍光色素の標識部位の塩基がCの場合はGが、又Gの場合はCが存在する。）。

【0082】

2) 標的核酸プローブと内部標準プローブの塩基配列の鎖長が同じである前記1)又は2)に記載の核酸測定用新規混合物。

3) 標的核酸プローブと内部標準プローブの塩基配列が同じである前記1)又は2)に記載の一種若しくは複数種の標的核酸を測定するための核酸測定用新規混合物。

4) 内部標準プローブの蛍光色素の標識部位の塩基に対応する標的核酸の塩基がG以外のものである前記1)～3)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。

【0083】

5) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が5'末端である前記1)～4)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。

6) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が3'末端である前記1)～5)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。

- 7) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が5'末端で、内部標準プローブの蛍光色素標識部位が3'末端である前記1)～6)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。
- 8) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が3'末端である前記1)～7)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。
- 9) 内部標準プローブの蛍光色素標識部位が5'末端である前記1)～8)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。

【0084】

- 10) 標的核酸プローブの蛍光色素標識部位が3'末端で、内部標準プローブの蛍光色素標識部位が5'末端である前記1)～9)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。
- 11) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブがQプローブである前記1)～10)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。
- 12) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブがQプローブである前記1)～10)の何れか一項に記載の核酸測定用新規混合物。
- 13) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブが、1本鎖のオリゴヌクレオチドの1つの部位を、ハイブリダイズした際に、蛍光強度を上昇させるような性質を有する蛍光色素で標識した核酸プローブである前記1)～12)の何れか一項に記載の新規反応液。

【0085】

- 14) 標的核酸プローブ及び／又は内部標準プローブが、それぞれ蛍光キャラクターの異なる少なくとも1種の色素で標識した核酸プローブである前記1)～13)の何れか一項に記載の新規反応液。
- 15) 標的核酸プローブと内部標準プローブの対が複数対の核酸プローブを含む新規混合物の場合は、対間の蛍光色素対も異なる前記1)～14)の何れか一項に記載の新規反応液。

【0086】

b) 核酸の新規測定方法。

即ち、前記a)～7)の何れか一項に記載の新規混合物を用いて1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。本発明方法は、前記の新規混合物を用いて標的核酸を測定する方法であれば、どのような方法でもよいのであるが、好適には以下の方法である。

【0087】

前記a)～7)の何れか一項に記載の核酸測定のための新規混合物に1種若しくは複数種の標的核酸を加えてハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の標的核酸プローブ及び内部核酸プローブの蛍光色素に由来する光学的キャラクター変化を各々測定し、各蛍光色素についての得られた測定値の比から1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

【0088】

本発明方法の最も簡単な標的核酸プローブ、内部標準核酸プローブ及び内部標準核酸を含む反応液を用いて、標的核酸を測定した場合の核酸測定方法を図1に示した。

当該方法においては、標的核酸プローブ、内部標準核酸プローブとして、Qプローブ（以下、QProbeという。）使用する。QProbeは蛍光消光プローブとも言われるものである。QProbeの最も典型的なものは、プローブの末端塩基Cを蛍光色素で修飾したものである。当該蛍光色素と、修飾塩基と相補的な位置に標的核酸内のグアニン（G）との相互作用によって発生する蛍光消光現象により遺伝子を検出する事が出来るプローブである。

最も簡単な標的核酸プローブ、内部標準核酸プローブ及び内部標準核酸を図1を参考に以下に説明する。図において、標的核酸プローブをQProbe A、内部標準核酸プローブをQProbe Bとしてある。

【0089】

標的核酸プローブ：

標的核酸と内部標準核酸とを区別しないでハイブリダイズするが、標識核酸とハイブリダイズした場合だけ標識蛍光色素の光学的キャラクター（蛍光発光）が変化（減少（消光））するように設計する。即ち、当該プローブがハイブリダイズする標的核酸の領域の塩基配列として、その1端塩基をG又はCとし、他端塩基をG及びC以外の塩基がくるようなものを選択する。標的核酸プローブの塩基配列はこのような塩基配列に相補的なもの（水素結合するもの、以下同じ意味である。この用語に対して、“対応する”なる用語は水素結合しない単なる対応を意味するものとする。以下同様である。）するが、前記の標的核酸の末端塩基でG及びC以外の塩基に相応する塩基として、標的核酸とは相補しない（水素結合しない）G又はCに設定にする。このことは、図1によく示されている。

【0090】

内部標準核酸プローブ:

塩基配列は標的核酸プローブと同じにする。但し、図1に示されているように、蛍光色素標識位置は標的核酸プローブとは反対側である。又、蛍光色素を異なったものにする。標的核酸と内部標準核酸とを区別しないでハイブリダイズするが、内部標準核酸とハイブリダイズした場合だけ標識蛍光色素の光学的キャラクター（蛍光発光）が変化（減少（消光））するように設計する。

【0091】

内部標準核酸

標的核酸プローブと内部標準核酸プローブとを区別しないでハイブリダイズするが、内部標準核酸プローブとハイブリダイズした場合だけ標識蛍光色素の光学的キャラクターが変化するように設計する。これを満たす内部標準核酸であれば、どのような構造のものでもよく、好適に使用できる。例えば、内部標準核酸の塩基配列は、両末端塩基を除き標的核酸と同一にしておくのが好適である。

内部標準核酸プローブの蛍光色素標識部位の塩基に相応する塩基は、プローブの塩基と相補する塩基に設計する。即ち、プローブの塩基がCの場合、内部標準核酸の塩基はGであり、又、プローブの塩基がGの場合、内部標準核酸の塩基はCである。蛍光色素非標識部位の塩基に相応する塩基は、プローブの塩基と相補しない塩基に設計する。好適にはアデニン（A）又はチミン（T）にする。

これにより、標的核酸プローブとの複合体に対する熱安定性と、内部標準核酸プローブとの複合体に対する熱安定性とは、ほとんど差がないため、両プローブは、標的核酸と内部標準核酸とを、区別することなく、無差別にハイブリダイズすると考えられる。

【0092】

以下、図1を用いてより具体的に解説する。QProbe Aは標的核酸とハイブリダイズした際に、蛍光ラベル（蛍光色素で標識）したCと相補的な位置にGが来るため著しく蛍光消光（蛍光強度が減少）（以下同じ意味である。）する。内部標準遺伝子の配列は、QProbe Aの5'末端のCと相補的な位置にアデニン（A）が、QProbe Aの3'末端のCと相補的な位置にGが来るようにしておく。このため、QProbe Aは、内部標準遺伝子とハイブリダイズしても、蛍光標識した5'末端と相補的な位置にGが存在しないため、著しく蛍光消光することはない。しかし、標的核酸とハイブリダイズした場合は、Gがくるので、著しく蛍光消光する。このため、QProbe Aは、その消光率の違いから標的遺伝子の特異的に検出することが可能である。

【0093】

また、QProbe Bについては、内部標準遺伝子とハイブリダイズした際には、3'末端に蛍光ラベルしたCと相補的な位置にGが来るため著しく蛍光消光するが、標的遺伝子では、3'末端に蛍光ラベルしたCと相補的な位置にAが来るため著しく蛍光消光は見られない。よって、QProbe Bは、QProbe Aとは逆に、内部標準遺伝子由来の増幅産物を特異的に検出することが可能となる。

【0094】

標的核酸の測定方法

本発明の新規混合物は前記のような構成物を含むので、当該反応液に標的核酸を加え、

ハイブリダイゼーション反応を行い、標的核酸プローブに由来する光学的キャラクター変化及び内部標準核酸プローブに由来する光学的キャラクター変化を測定して、得られた測定値の比を計算し、当該計算値に内部標準核酸の濃度を乗ずることにより、標的核酸の濃度が分かる。

【0095】

即ち、前記の各QProbeのハイブリダイゼーションは、標的遺伝子と内部標準遺伝子とを区別することなく、無差別に起こる。よって、各プローブがどちらの遺伝子にハイブリダイズするかは、各遺伝子の存在比に完全に依存している。このため、QProbe Aに由来する光学的キャラクター変化を測定して得られた測定値とQProbe Bに由来する光学的キャラクター変化を測定して得られた測定値の比は、標的核酸と内部標準核酸の構成比でもある。

【0096】

本発明の核酸の新規測定方法は、前述したように核酸の存在比（構成比）を求める手法であるため、標的核酸と内部標準核酸を合わせた濃度が、標的核酸プローブ濃度と内部標準核酸プローブ濃度を合わせた濃度より高い場合（核酸濃度がプローブ濃度より高い場合）であっても、内部標準核酸の濃度が当該構成比を求めるのに適正な濃度であれば（内部標準核酸の濃度が、標的核酸の濃度に十分近ければ）、標的核酸と内部標準核酸の構成比を求めることが可能であり、その結果として、標的核酸の濃度を正確に定量することが出来る。このため本発明方法は、1) 標的遺伝子を含む溶液を希釈する必要性がない、2) プローブ添加濃度は、蛍光検出に使用する装置が、検出可能な範囲内において、最も低い濃度に設定すれば良く、その濃度を変化させる必要性がない。つまり、本法は、1) 標的遺伝子の希釈工程が不要、2) プローブの濃度を変化させることが不要、といった特徴を有しており、前述の既存法の問題点を解決することが可能である。

【0097】

本発明においては、以下のプローブ及びキット類も本発明の中に入る。

- 1) 前記1)～15)の何れか一項に記載の標的プローブ及び内部標準プローブからなる一対若しくは複数対の核酸プローブ。
- 2) 前記1)～15)の何れか一項に記載の標的プローブ及び内部標準核酸プローブからなる一対若しくは複数対の核酸プローブと前記1)に記載の、当該核酸プローブ対と対応する1種若しくは複数種の内部標準核酸とを含む核酸測定用キット類。

【0098】

第2発明：

1種若しくは複数種の内部標準核酸及び1種若しくは複数種の標的核酸プローブのみを含む新規混合物、及びそれを用いた核酸測定方法である。この発明においては、内部標準核酸プローブは用いない。そして二つの発明1及び発明2からなる。

【0099】

発明1：

内部標準核酸（標的核酸とは異なった塩基配列部分を有する。）と標的核酸プローブを含む新規混合物、及びそれを用いた、 T_m 値測定に基づく核酸測定方法a) 新規混合物

- 1) 下記のタイプの標的核酸プローブと下記のタイプの内部標準核酸との対を1種若しくは複数種の対を含むことを特徴とする、 T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

【0100】

標的核酸プローブ：1本鎖の蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドからなる核酸プローブで、且つ標的核酸及び内部標準核酸にハイブリダイズできる標的核酸プローブで、標的核酸及び内部標準核酸にハイブリダイズしたときに、標識された蛍光色素の光学的キャラクターが変化する標的核酸プローブ。複数種の核酸プローブの場合、各プローブの蛍光色素が異なる。

内部標準核酸：上記核酸プローブが標的核酸とハイブリダイズする部位の塩基配列と、内部標準核酸とハイブリダイズする部位との塩基配列が一部異なる。
内部標準核酸とハイブリダイズする部位の塩基配列は標的核酸と同じであるが、それ以外の部位核酸プローブの蛍光色素標識部位の塩基配列は標的核酸と同じであるが、それ以外の部位

の塩基配列の1部が異なった配列を有する。

【0101】

本発明において、下記の場合好適である。

2) 核酸プローブの蛍光色素標識部位が塩基C部位である前記1)に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。3) 一種の蛍光色素で標識された核酸プローブである前記1)～2)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

4) 核酸プローブがQプローブである前記1)～3)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。5) 核酸プローブが、標的核酸及び／又は内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、光学的変化が増加するものである前記前記1)～3)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

なお、上記の核酸プローブの具体的形態は、上記に特徴づけた点を除いて第1発明の場合と同様である。

【0102】

b) 核酸の新規測定方法

1) 前記に記載の T_m 値測定に基づく標的核酸を測定するための新規混合物を用いて標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

本発明方法は、前記に記載の T_m 値測定に基づく標的核酸を測定するための新規混合物を用いて標的核酸を測定する方法であれば、どのような方法でもよいのであるが、好適には下記2)の方法である。

2) 前記に記載の T_m 値測定に基づく標的核酸を測定するための新規混合物に、1種若しくは複数種の標的核酸を加え、ハイブリダイゼーション反応を行った後、反応液の温度を徐々に上げながら、反応液の蛍光強度を測定した後、下記の手順により、標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

【0103】

手順:

- (1) 測定された光学的キャラクターの変化のカーブを描く。
- (2) 当該カーブを微分する。
- (3) 得られた各ピークの高さを測定する。又は各ピークを積分してピークの面積を求める。
- (4) 内部標準核酸のピークの高さ又はピーク面積に対する標的核酸のピークの高さ又はピーク面積の比(標的核酸の高さ/内部標準核酸の高さ、又は標的核酸の面積/内部標準核酸の面積)を求める。
- (5) 当該比と内部標準核酸の濃度を乗ずる。

【0104】

c) 前記24に記載の核酸プローブ及び内部標準核酸を含む核酸測定キット類

【0105】

QProbeは、標的遺伝子と解離した際には、蛍光色素とグアニン間の相互作用は解消され、再び蛍光を発するようになる。よって、温度変化させながら、蛍光を連続的にモニタリングすることで、解離曲線を迅速・簡便に得ることが出来る。解離曲線を微分することで解離ピークを得ることが出来るが、解離ピークの高さ比(又は、解離ピークの面積比)は、遺伝子構成比に依存する。本法では、この解離ピークから遺伝子構成比を求める。

【0106】

本法も、内部標準遺伝子を添加する手法であり、用いる内部標準遺伝子は、QProbeがハイブリダイズする部位に変異を入れたものを使用する。よって、標的遺伝子との間にミスマッチが存在しないQProbeを使用した場合は、内部標準遺伝子にはミスマッチが存在する事となる。この場合、内部標準遺伝子とQProbeとの解離は、標的遺伝子とQProbeとの解離よりも、低い温度で起こる(図2参照)。このため、標的遺伝子、内部標準遺伝子が混在した場合、その解離曲線は、2つの解離曲線が混合された状態のものが得られ、内部標準

遺伝子とQProbeとの T_m 値と、標的遺伝子とQProbeとの T_m 値とに十分な差があれば、その解離ピークを完全に2つに分離することが出来る(図2参照)。この解離ピークの高さの比は、遺伝子の構成比に高い相関があるため、解離ピークの高さの比から、遺伝子の構成比を求めることが出来る。よって、標的遺伝子の定量が可能となる。

【0107】

本法において、内部標準遺伝子に必要とされる要件としては、標的遺伝子の解離ピークと、内部標準遺伝子の解離ピークとが、遺伝子の比を求めることができるよう、十分に分離する、という点を挙げることができる。よって、これを満たす内部標準遺伝子であれば、どのようなものを使用しても本法を適用性は損なわれない。

【0108】

本法も、前述の2つのQProbeを用いた遺伝子定量法と同様、遺伝子構成比を求め標的遺伝子量を定量する手法であるため、プローブ濃度が標的遺伝子と内部標準遺伝子を合わせた濃度より低い場合であっても、内部標準遺伝子の濃度が構成比を求めるのに適正な濃度であれば、標的遺伝子濃度を正確に定量することが出来る。このため、本法も、1) 標的遺伝子の希釈工程が不要、2) プローブの濃度を変化させることが不要、といった特徴を有しており、既存法の問題点を解決することが可能である。

【0109】

発明2.

内部標準核酸と2重標識核酸プローブを用いる反応液、及びそれを用いた核酸測定方法。

1) 新規混合物

下記タイプの内部標準核酸と下記タイプの二重標識核酸プローブの一对の1種若しくは複数種を含むことを特徴とする新規混合物。

【0110】

二重標識核酸プローブ: 1本鎖のオリゴヌクレオチドの部位1(末端塩基部、鎖中部を含む。)の塩基シトシン(C)部位(塩基部、糖部、リン酸部を含む。)を、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素1で標識し、更に部位1とは異なった位置にあり、且つ対応する標的核酸の塩基がG以外のものである部位2の塩基をCに替えたC部位(塩基部、糖部、リン酸部を含む。)を、蛍光色素1とは異なった蛍光色素で、且つ標識部位の塩基に対応する標的核酸がGの場合、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素2で標識した二重標識核酸プローブ。

【0111】

内部標準核酸: 前記二重標識核酸プローブにおける一つの蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基がグアニン(G)以外のものであり、他の蛍光色素の標識部位の塩基に対応する塩基がGである。

【0112】

以下の場合、更に好適になる。

2) 二重標識核酸プローブがQプローブである前記に記載の新規混合物。

3) 二重標識核酸プローブが、標的核酸及び/又は内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、光学的変化が増加するものである1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

なお、上記の核酸プローブの具体的形態は、上記に特徴づけた点を除いて、好適には第1発明の場合と同様である。

【0113】

2) 核酸の新規測定方法

(1) 前記に記載の新規混合物に1種若しくは複数種の標的核酸を用いて1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

本発明方法は、前記の新規混合物を用いて標的核酸を測定する方法であれば、どのような方法でもよいのであるが、好適には下記2)の方法である。

(2) 前記に記載の新規混合物に1種若しくは複数種の標的核酸を加えてハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の蛍光色素1及び蛍光色素2に由来する光学的キャラクター変化を測定し、得られた測定値の比から1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

【0114】

前述の内部標準遺伝子を用いた新規遺伝子定量手法に関する問題点

i) これまで、グアニンと相互作用して著しく蛍光消光し、励起波長、蛍光波長などの蛍光特性の異なる蛍光色素は、2種類確認されているのみあり、QProbeを用いて、同一溶液系内に存在する2種類以上の遺伝子を、同時に検出することは不可能であった。このため、2種以上の遺伝子を検出したい場合は、サンプル数を増加させるしか手段がなく、結果的にQProbeを用いた遺伝子定量手法の高コスト化につながっている。

【0115】

ii) 前述した新規遺伝子定量手法である2つのQProbeを用いた遺伝子定量法では、均一溶液系プローブを2種使用する。各QProbeは、標的遺伝子と内部標準遺伝子のうち、どちらか一方とハイブリダイズした際に、蛍光の消光が発生する。また、本定量法で用いるQProbeは、標的遺伝子と内部標準遺伝子を区別しないでハイブリダイズし、例えば、標的遺伝子あるいは内部標準遺伝子にハイブリダイズしたプローブの半量は、蛍光消光しないこととなる。その結果、得られる蛍光消光率があまり大きくないため、特に遺伝子量が少ない場合は、分析誤差が大きくなるという問題点があった。

【0116】

前述の課題は、前記の本発明により達成される。即ち、QProbeの各末端に、各1種類の蛍光色素を標識することで解決可能であると考えられる(図3参照)。このような異なる色素で2重標識したQProbe(Switching probeと呼ぶ)を用いることで、標的遺伝子、内部標準遺伝子のどちらにハイブリダイズした場合も、蛍光消光が発生することとなる。つまり、ハイブリダイズしたプローブで、蛍光消光しないプローブは存在しないこととなる。このため、2種のQProbeを用いた場合と比較して、理論上2倍蛍光消光率が増加し、その結果、検出感度を2倍向上させることが可能となる(図3参照)。

【0117】

第3発明

前記発明と核酸増幅方法を合わせた発明である。核酸増幅方法で得られた増幅産物を前記核酸測定方法で測定する方法である。遺伝子増幅方法で得られたどのような産物にも適用できる。特に、前記発明の1種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により1種若しくは複数種の標的核酸を増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、核酸の前記測定方法で測定する方法である。以下の発明A、発明B及び発明Cからなる。

【0118】

1. 発明A

1) 第1発明の前記1)に記載の1種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により1種若しくは複数種の標的核酸を増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、標的核酸を測定する方法、また、

【0119】

1) 第1発明の前記1)に記載の1種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により1種若しくは複数種の標的核酸を増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、第1発明の前記1)～5)の何れか一項に記載の新規混合物を用いて、1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規測定方法である、又、

【0120】

3) 第1発明の前記1)に記載の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により標的核酸を定常期に到るまで(定常期を含む。)増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、第1発明の前記1)～15)の何れか一項に記載の新規混合物を用いて、1種

若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である、又、

【0121】

4) 標的核酸のプライマーと内部標準核酸のプライマーとして同じものを用いた核酸増幅方法である前記1)～3)の何れか一項に記載の1種若しくは複数種の増幅前の核酸を測定する方法である、又、

5) プライマーがQプローブである前記4)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法である、又、

6) プライマーが標的核酸及び／又は内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、光学的变化が増加するものである前記5)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法である。

【0122】

本発明においては、遺伝子増幅方法で得られたどのような産物にも適用できるのであるが、特に従来不可能とされていた遺伝子増幅産物、即ち定常期まで（定常期を含む。）増幅された遺伝子増幅産物について好適に適用される。

【0123】

発明B

1) 第2発明の発明1に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための1種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により1種若しくは複数種の標的核酸を増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、標的核酸を測定する方法、また、

【0124】

2) 第2発明の発明1に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための1種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により1種若しくは複数種の標的核酸を増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、第2発明の前記1)～3)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物を用いて、1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を、 T_m 値測定に基づいて1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である、又、

【0125】

3) 第2発明の発明1に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により標的核酸を定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、第2発明の発明1に前記a)～4)の何れか一項に記載の T_m 値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物を用いて、1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を、 T_m 値測定に基づいて1種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である、又、

【0126】

5) 標的核酸のプライマーと内部標準核酸のプライマーとして同じものを用いた核酸増幅方法である前記1)～3)の何れか一項に記載の1種若しくは複数種の増幅前の核酸を測定する方法である、又、

5) プライマーがQプローブである前記4)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法である、又、

6) プライマーが標的核酸及び／又は内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、光学的变化が増加するものである前記4)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法である。

【0127】

本発明においては、遺伝子増幅方法で得られたどのような産物にも適用できるのであるが、特に従来不可能とされていた遺伝子増幅産物、即ち定常期まで（定常期を含む。）増幅された遺伝子増幅産物について好適に適用される。

【0128】

発明 C

1) 第2発明の発明2に記載の1種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により1種若しくは複数種の標的核酸を増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規測定方法である、又、

【0129】

2) 第2発明の発明2に記載の1種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により1種若しくは複数種の標的核酸を増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、第2発明の発明2の前記1)～3)の何れか一項に記載の新規混合物を用いて、1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする標的核酸の新規測定方法である、又、

【0130】

3) 第2発明の発明2に記載の内部標準核酸を含む反応系で遺伝子増幅方法により標的核酸を定常期に到るまで(定常期を含む。)増幅し、得た反応液若しくは増幅産物を試料として、第2発明の発明2の1)～3)の何れか一項に記載の新規混合物を用いて、1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である、又、

【0131】

4) 標的核酸のプライマーと内部標準核酸のプライマーとして同じものを用いた核酸増幅方法である前記1)～3)の何れか一項に記載の1種若しくは複数種の増幅前の核酸を測定する方法である、又、

5) プライマーがQプローブである前記4)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法である、又、

6) プライマーが標的核酸及び／又は内部標準核酸にハイブリダイズしたとき、光学的変化が増加するものである前記5)に記載の1種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法である。

【0132】

本発明においては、遺伝子増幅方法で得られたどのような産物にも適用できるのであるが、特に従来不可能とされていた遺伝子増幅産物について適用される。

【0133】

遺伝子増幅法を介した遺伝子定量法の問題点

遺伝子増幅法を介した遺伝子定量法は、標的遺伝子を増幅し、定量を行う手法であるため、非常に感度が高く、僅かにしか存在しない標的遺伝子であっても定量する事も可能であるため、現在最も汎用されている遺伝子定量手法の1つとなっている。遺伝子増幅法を介した遺伝子定量法は、各種知られているが、以下に示すような問題点が存在している。以下、その内容を詳細に示す。

【0134】

(1) 既存法の問題点

i) 既存法の問題点1:リアルタイム定量的PCR法

現在最も汎用されている遺伝子増幅法であるPCR法では、増幅産物がある程度蓄積するまで、指数関数的に反応が進行することが知られている。しかしながら、増幅産物が増加するにつれて、増幅効率は低下し、最終的には増幅産物量は一定の値をとる(プラトーに達する)。このことは、増幅反応を十分に実施した場合、初期の遺伝子の量に関わらず、得られる増幅産物量は変わらないということを示している。以上より、増幅反応完了後の(エンドポイントでの)増幅産物量から、初期の遺伝子量を定量する事はできない。本特徴は、PCR法に限らず、現在報告されている遺伝子増幅法に共通の特徴である。

【0135】

しかしながら、一般的な遺伝子増幅法における初期反応段階の増幅効率は、初期遺伝子量に関わらず一定である。このため、増幅産物がある一定量(閾値)に達するのに必要な

サイクル数は、指数関数的に増幅が発生する領域であれば、初期遺伝子の量に依存する。例えば、数段階の希釈系列を設けた既知濃度の標的遺伝子をPCR増幅した場合、増幅産物量が閾値に達するサイクル数（C_T値）は、初期の遺伝子量と、逆相関の関係にある。

【0136】

これは前述したように、初期反応段階の増幅効率が初期遺伝子量に関わらず一定であるためである。この関係式は、未知試料中の標的遺伝子を定量するための検量線として使用することができる。通常の場合、未知試料についても標的遺伝子の増幅効率は、一定であると考えられるため、同様にC_T値を求め、上記の検量線にあてはめることで、初期の遺伝子量を定量する事が可能となる。これらのことから、増幅産物をリアルタイムにモニタリングする事ができれば、初期遺伝子量の定量が可能となるといえる。

【0137】

本原理に基づく遺伝子定量手法が、リアルタイム定量的PCR法である。本法は、（１）ポストPCR工程が必要なく簡便・迅速、（２）反応チューブを解放する必要性が無く、増幅産物によるコンタミの心配がないといった、といった優れた特長を有する。しかしながら、その一方で（１）産物をリアルタイムにモニタリングする必要があるため、装置が大がかり且つ高価となる、（２）検量線を作成した際の増幅効率と、未知試料中の標的遺伝子の増幅効率が全く同じであるという仮定に基づく手法であるが、未知試料中に遺伝子増幅の阻害物質が存在する場合、この仮定が成り立たなくなる。即ち、常に正しい定量値が得られているとは言い難い、（３）本手法では、増幅産物をリアルタイムモニタリングする必要があるため、遺伝子増幅の間、1台の測定装置が占有されることとなる。このため、サンプル処理能力には自ずと限界がある、といった問題点がある。

【0138】

ii) 既存法の問題点2：競合的PCR法

目的の遺伝子を高感度に定量するための手法として、競合的PCR法（図4参照）も一般的に知られている。本法は、以下の工程より実施される。まず、標的遺伝子を増幅するためのプライマーと同じプライマーで増幅される既知濃度の遺伝子（内部標準遺伝子と呼ぶ）を反応液に添加しておき、これを標的遺伝子と同時に増幅させる。次に、標的遺伝子由来の増幅産物と内部標準遺伝子由来の増幅産物とを、増幅終了後に、電気泳動などの分離手法を用いて分離・定量し、増幅産物の比（内部標準遺伝子由来の増幅産物／標的遺伝子由来の増幅産物）を求める。標的遺伝子と内部標準遺伝子とは、共通のプライマーにて増幅するため、それぞれの増幅効率は同じと考えられる。よって、初期添加した内部標準遺伝子量に、増幅産物の比を乗じることで標的遺伝子量を求める事が可能となる。

【0139】

本法は、内部標準遺伝子を標的遺伝子と共存させて、遺伝子増幅を実施するため、増幅阻害物質の影響を受けにくい手法であり、得られた定量値の信頼性は高い手法であるといえる（理由：例え増幅阻害物質が存在したとしても、内部標準遺伝子の増幅効率と、標的遺伝子の増幅効率は、全く同じように低下する。このことより、増幅阻害物質の存在は、産物比に影響を与えないため、競合的PCR法では正しい定量値が得られる）。また、装置が比較的簡易且つ安価といった特長も挙げることが出来る。

【0140】

しかしながら、本法は、（１）遺伝子増幅後に、増幅産物を定量する必要があるため、操作が煩雑かつ時間がかかる、（２）産物を定量する際、反応チューブを解放するため、増幅産物によるコンタミの原因となる、（３）本手法は、工程が煩雑且つその自動化は困難であるため、サンプル処理能力が低い、といった問題点が指摘されている。

【0141】

iii) 既存法の問題点3：リアルタイム競合的PCR法

リアルタイム競合的PCR法は、競合的PCR法の改良法であり、TaqManプローブ、QProbeなど蛍光標識核酸プローブにて、内部標準遺伝子由来の増幅産物と標的遺伝子由来の増幅産物を、同時にリアルタイムにモニタリングし、それぞれの増幅産物由来の蛍光シグナルから、初期の標的遺伝子量を定量する手法である。

【0142】

本法は、(1) ポストPCR工程が必要なく簡便・迅速、(2) 反応チューブを解放する必要が無い、(3) 競合法であるため阻害物質の影響を受けにくい、といった優れた特長を有する手法である。しかしながら、内部標準遺伝子由来の増幅産物と標的遺伝子由来の増幅産物を、同時にリアルタイムにモニタリングする必要があるため、リアルタイム定量的PCR法と同様、(1) 装置が大がかり且つ高価となる、(2) サンプル処理能力が低い、という問題点が存在する。以上、既存法の問題点を以下の表にまとめた。この表から、現在提案されている遺伝子定量法には、何らかの問題点が存在することが分かる。

【0143】

表1 既存の遺伝子定量手法の問題点

課題	リアルタイム 定量的PCR法	競合的PCR法	リアルタイム 競合的PCR法	望まれる手法
迅速性、操作の簡便性	○	×	○	○
産物によるコンタミの 防止	○	×	○	○
阻害物質の影響	×	○	○	○
装置価格	×	○	×	○
サンプル処理能力	×	×	×	○

【0144】

なお前述の遺伝子定量法は、NASBA法、LAMP法、RCA法、ICAN法など、PCR法以外の遺伝子増幅手法にも適用可能であるため、現在、様々な遺伝子増幅法を介した遺伝子定量手法も実施されている。しかしながら、PCR法を介した遺伝子増幅手法と全く共通の問題点を抱えており、どの遺伝子増幅法を介した場合でも、前述の問題点を解決する必要がある。

【0145】

(2) 本課題を解決するための方策

前述のように、標的遺伝子由来の増幅産物と内部標準遺伝子由来の増幅産物との比から、初期の標的遺伝子量を定量することが可能である。もし、この増幅産物比を、遺伝子増幅反応終了後（エンドポイントで）、反応チューブを開放することなく、迅速且つ簡便に測定することができれば、(1) ポストPCR工程が必要なく簡便・迅速、(2) 反応チューブを解放する必要が無く、増幅産物によるコンタミの心配がない、(3) 競合法であるため阻害物質の影響を受けにくい(4) 遺伝子増幅と増幅産物の検出とを完全に分離できるため、大量サンプルの処理が可能となり、既存法の共通の問題点であったサンプル処理能力を、簡便且つ安価に向上させる事が可能（例えば、蛍光測定機能を持たない安価なPCR装置を、複数台用いて遺伝子増幅した後、蛍光測定装置にて順次解析することで、例えば蛍光測定装置が一台であっても大量サンプルの処理が可能となる）、(5) 増幅の過程をリアルタイムモニタリングする必要が無く、PCR反応に不可欠なサーマルサイクラーとしての機能が不要となるため、非常に簡便かつ安価な測定装置で遺伝子定量が可能、といった特長を有する極めて優れた遺伝子定量法となりうると考えられる。

【0146】

既存法である競合的PCR法は、エンドポイントで増幅産物比を求めることが可能であ

るが、反応チューブを開放する必要性があり、迅速に増幅産物比を求めることは出来ない。同じく既存法であるリアルタイム競合的PCR法は、蛍光修飾プローブを用いて検出するため、反応チューブを開放する必要性はなく、増幅産物検出は非常に迅速に行える。しかしながら、既存の蛍光修飾プローブにより得られる蛍光シグナルの比は、常に増幅産物比を定量的に示している訳ではなく、その領域は限られている。従って、増幅産物の比を求めるためには、蛍光シグナル比と増幅産物比とが定量的な関係を示す領域で、各増幅産物を検出する必要性がある。このため、リアルタイム競合的PCR法では、増幅産物を常にモニタリングする必要性がある。以上より、前述したような、増幅産物との比を、反応チューブを開放することなく、エンドポイントで迅速且つ簡便に測定可能な手法は、これまで存在しなかった。

【0147】

上記を鑑み、検討を進めた結果、我々は、増幅産物の比を、エンドポイントにて測定可能な新規手法を発見した。本発明は、本発見に基づく新規遺伝子定量法および新規核酸プローブに関するものである。以下、その内容を詳細に説明する。

【0148】

i) QProbeを用いたエンドポイント遺伝子定量法

<QProbeによる標的遺伝子および内部標準遺伝子の特異的検出>

本法では、前述した2重蛍光標識QProbe (Switching probe) あるいは、2種のQProbeを用いて、増幅産物の検出を実施する。本説明では、Switching probeを用いた測定方法について解説した。Switching probeは、(1) プローブの両末端塩基はCである、(2) 両末端が異なる色素で蛍光標識されている、という特長を有している。内部標準遺伝子の配列は、標的遺伝子においてはSwitching probeの5'末端のCと相補的な位置に存在するGをアデニン(A)に、Switching probeの3'末端のCと相補的な位置に存在するAを、Gに、それぞれ置換してある。このため、Switching probeは、内部標準遺伝子由来の増幅産物とハイブリダイズした場合、5'末端と相補的な位置にGが存在しないため、5'末端に標識した色素が著しく蛍光消光しないが、3'末端には相補的な位置にGが存在するため、3'末端に標識した色素が著しく蛍光消光する。

【0149】

一方、標的遺伝子由来の増幅産物とハイブリダイズした場合は、5'末端と相補的な位置にGが存在するため、5'末端に標識した色素が著しく蛍光消光するが、3'末端には相補的な位置にGが存在しないため、3'末端に標識した色素が著しく蛍光消光しない。つまり、どちらの末端に標識した色素が蛍光消光したかを観察することにより、各増幅産物の特異的に検出することが可能となる。

【0150】

<内部標準遺伝子の特長>

内部標準遺伝子の配列は、(1) 標的遺伝子と共通のプライマーで増幅可能、(2) 標的遺伝子と内部標準遺伝子のGC含量は、全く同一、(3) 標的遺伝子由来の増幅産物とハイブリダイズした際の、完全相補的な部分の塩基長と、内部標準遺伝子由来の増幅産物とハイブリダイズした際の完全相補的な部分の塩基長は全く同一、(4) 標的遺伝子と、内部標準遺伝子の塩基配列は、QProbeの両末端と相補的な塩基を除き同一、といった特徴を有する。

【0151】

以上より、Switching probeの標的遺伝子由来の増幅産物に対する親和性と、内部標準遺伝子由来の増幅産物に対する親和性とは、ほとんど差がないと考えられる。つまり、Switching probeは、標的遺伝子由来の増幅産物と内部標準遺伝子由来の増幅産物とを区別することなく、完全にランダムにハイブリダイゼーションするため、標的遺伝子由来の増幅産物に結合したSwitching probeと内部標準遺伝子由来の増幅産物に結合したSwitching probeとの比は、標的遺伝子由来の増幅産物と内部標準遺伝子由来の増幅産物との比と、完全に一致する。よって、Switching probeの両末端に標識した2種の色素から得られる蛍光消光率より、増幅産物の比を求めることが出来る。

【0152】

また、(1) プライマーは標的遺伝子と内部標準遺伝子共通であり、(2) 標的遺伝子と内部標準遺伝子のGC含量は、全く同一、(3) 塩基配列が2箇所異なる以外は、標的遺伝子と内部標準遺伝子は同じ塩基配列を有するため、標的遺伝子と内部標準遺伝子の増幅効率は、同じであると考えられる。また、(2)、(3)より、増幅産物が再結合する事によって発生するバイアスは、発生しないと考えられる。よって、増幅産物構成比は、初期遺伝子構成比を保持することが可能となる。しかしながら、原理的に内部標準遺伝子として必要とされる要件は、(1) どの増幅段階においても、初期遺伝子の比が崩れない(増幅効率が標的遺伝子と同じ)、(2) プローブが、標的遺伝子由来の増幅産物と内部標準遺伝子由来の増幅産物とに区別しないでハイブリダイズする、という2点を挙げることができ、これら2点を満たす内部標準遺伝子であれば、必ずしも上記の特長を有する内部標準遺伝子である必要性はない。

【0153】

前述のように、Switching probeの両末端に標識した2種の色素から得られる蛍光消光率より、増幅産物を定量的に求めることが可能となる。

【0154】

以上より、前述した性質を有する内部標準遺伝子およびSwitching probeを使用することで、増幅産物の比を、反応管を開放することなくエンドポイントで、迅速、且つ簡便に求めることが可能となる。また、エンドポイントでの測定が可能となるため、前述のように、多サンプル処理を安価に実施可能となる。

【0155】

本発明の遺伝子定量法は、遺伝子増幅の後、標的遺伝子と内部標準遺伝子の増幅産物の比を求め、標的遺伝子の定量する手法である。このため、標的遺伝子と内部標準遺伝子とを、その初期構成比を保持したまま、増幅できる遺伝子増幅法であれば、その種類に依らず、本法を適用することが可能である。よって、NASBA法、LAMP法、RCA法、ICAN法など、PCR法以外の遺伝子増幅手法にも適用可能である。

【0156】

ii) QProbeを用いた解離曲線解析によるエンドポイント遺伝子定量法

前述したようにQProbeにより得られる解離曲線解析から、遺伝子構成比を求めることが可能である。本手法を、遺伝子増幅法を介した競合的遺伝子定量法に応用することが可能であると考えられる。

【0157】

本法で用いる内部標準遺伝子は、QProbeがハイブリダイズする部位に変異を入れたものを使用する。遺伝子増幅完了後、この解離ピークの高さの比は、遺伝子の構成比に高い相関があるため、解離ピークの高さの比から、遺伝子の構成比を求めることが出来る。よって、標的遺伝子と増幅効率の同じ、既知濃度の内部標準遺伝子を、標的遺伝子とともに各種遺伝子増幅法によって増幅し、標的遺伝子由来の増幅産物と内部標準遺伝子由来の増幅産物との比を求めることで、標的遺伝子の定量が可能となる。

【0158】

本法において、内部標準遺伝子に必要とされる要件としては、(1) どの増幅段階においても、初期遺伝子の比が崩れない(増幅効率が標的遺伝子と同じ)、(2) 標的遺伝子の解離ピークと、内部標準遺伝子の解離ピークとが、遺伝子の比を求めることができるよう、十分に分離する、という2点を挙げることができる。よって、これら2点を満たす内部標準遺伝子であれば、必ずしも上記の特徴を有する内部標準遺伝子である必要性はない。

【0159】

本発明の遺伝子定量法は、標的遺伝子と内部標準遺伝子とを、その初期構成比を保持したまま、増幅できる遺伝子増幅法であれば、その種類に依らず、本法を適用することが可能である。よって、NASBA法、LAMP法、RCA法、ICAN法など、PCR法以外の遺伝子増幅手法にも適用可能である。

【0160】

第4発明

一つの系に存在する標的核酸の存在比を測定する方法である。次の発明 a、b、c 及び d からなる発明である。尚、一つの系に存在する標的核酸は核酸増幅方法で9増幅されたものは好適に利用出来る。更に、前記記載の各種の内部標準核酸を含む反応液で増幅して得られたものはより好適である。そして、この内部標準核酸を基準に存在比を求めるのが好適である。

【0161】

1. 発明 a

1) 既知濃度の内部標準核酸を反応液に添加して、標的核酸を検出定量する核酸定量手法において、内部標準核酸と標的核酸とを区別せずハイブリダイズするが、ハイブリダイズした核酸が内部標準核酸であるか標的核酸であるかを認識可能な核酸プローブを用いて、標的核酸と内部標準核酸との構成比を求め、本構成比から標的核酸を定量することを特徴とする標的核酸の新規定量方法、又、

【0162】

2) 前記1)で使用する核酸プローブ、内部標準核酸が、第1発明～第3発明の何れかに記載の標的核酸の新規定量方法、又、

3) 第1発明～第3発明の何れかに記載の核酸測定のための新規反応液において、一種若しくは複数種の標的核酸存在下でハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の標的核酸プローブ及び内部核酸プローブの蛍光色素に由来する蛍光キャラクター変化を測定し、得られた測定値の比から一種若しくは複数種の標的核酸を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法、又、

【0163】

4) 第1発明～第3発明の何れかに記載の核酸プローブからなる一種若しくは一対、または、複数種若しくは複数対の核酸プローブと当該核酸プローブと対応する一種若しくは複数種の内部標準核酸とを含む核酸測定用キット類、又、

【0164】

5) 第1発明～第3発明の何れかに記載の一種若しくは複数種の内部標準核酸を含む反応系において、遺伝子増幅方法により一種若しくは複数種の標的核酸、および標的核酸に対応する一種若しくは複数種の内部標準核酸を増幅し、得られた反応液若しくは増幅産物を試料とし、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法、又、

【0165】

6) 第1発明～第3発明の何れかに記載の内部標準核酸を含む反応系において遺伝子増幅方法により標的核酸を定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅し、得られた反応液若しくは増幅産物を試料として、第1発明～第3発明の何れかに記載の新規反応液を用いて、一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法、又、

【0166】

7) 標的核酸と内部標準核酸とを共通のプライマーで増幅する核酸増幅方法である前記5)又は6)に記載の一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法、又、

8) プライマーがQプローブである前記5)～7)に記載の一種若しくは複数種の増幅前の標的核酸を測定する方法。

【0167】

9) 標的核酸が遺伝子増幅方法で増幅されたものであり第1発明～第3発明の何れかに記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

10) 標的核酸が、遺伝子増幅方法により定常期に到るまで（定常期を含む。）増幅されたものであり、第1発明～第3発明の何れかに記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

【0168】

11) 標的核酸および内部標準核酸が遺伝子増幅方法で増幅されたものであり、第1発明～第3発明の何れかに記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

12) 標的核酸および内部標準核酸が、遺伝子増幅方法により定常期に到るまで(定常期を含む。)増幅されたものであり、第1発明～第3発明の何れかに記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法、又、

【0169】

13) 標的核酸と内部標準核酸が、同一のプライマーにより増幅されたものであり、第1発明～第3発明の何れかに記載の新規反応液を用いる核酸の新規測定方法。

【0170】

2. 発明 b

次の新規混合物及び核酸測定方法からなる。

a) 新規混合物

下記の核酸プローブを1種若しくは2種の含むことを特徴とする少なくとも2種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物である。

【0171】

核酸プローブ: 1本鎖のオリゴヌクレオチドの1部位(末端塩基部、鎖中部を含む。)で、且つ他の核酸プローブの部位とは異なった部位の塩基シトシン(C)部位(塩基部位、糖部位、リン酸部位を含む。)を、対応する標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的特性が変化する蛍光色素で、且つ他の核酸プローブの蛍光色素とは異なった蛍光色素で標識した核酸プローブ。当該プローブが複数の場合、各々蛍光色素が異なる。

【0172】

なお、上記の核酸プローブの具体的形態は、上記に特徴づけた点を除いて、好適には第1発明の場合と同様である。

又、標的核酸の1つが第1発明に記載の内部標準核酸であっても構わない。この場合、これを基準にした存在比になる。

【0173】

b) 核酸の新規測定方法

1) 前記に記載の少なくとも2種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物を用いて少なくとも2種の標的核酸の存在比を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

2) 又、前記に記載の複数種の標的核酸の存在比を測定するための新規混合物に、少なくとも2種の標的核酸を加え、ハイブリダイゼーション反応を行い、各核酸プローブの蛍光色素の光学的特性変化を測定し、得られた測定値の比から複数種の標的核酸の存在比を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

【0174】

3. 発明 c

次の新規混合物及び核酸測定方法からなる。

下記のタイプの標的核酸プローブを1種若しくは複数種含むことを特徴とする、T_m値測定に基づく1種若しくは複数種の標的核酸を測定するための新規混合物。

【0175】

標的核酸プローブ: 一本鎖のオリゴヌクレオチドからなり、少なくとも2種の標的核酸にハイブリダイズできる。そして、1部位の塩基C部位が蛍光色素で標識された核酸プローブで、標的核酸にハイブリダイズしたときに、標識された蛍光色素の光学的特性が変化する標的核酸プローブ。複数種の核酸プローブの場合、各プローブの蛍光色素が異なる。

【0176】

2) 核酸プローブがQプローブである前記に記載のT_m値測定に基づく少なくとも2種の標的核酸を測定するための新規混合物。

なお、上記の核酸プローブの具体的形態は、上記に特徴づけた点を除いて、好適には第1発明の場合と同様である。

又、標的核酸の1つが前記第2発明の発明1に記載の内部標準核酸であっても構わない。この場合、これを基準にした存在比になる。

【0177】

b) 核酸の新規測定方法

1) 前記に記載の T_m 値測定に基づく標的核酸を測定するための新規混合物に、少なくとも 2 種の標的核酸を加え、ハイブリダイゼーション反応を行った後、反応液の温度を徐々に上げながら、反応液の蛍光強度を測定した後、下記の手順により、標的核酸の存在比を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

【0178】

手順: (プローブ毎にこの操作を行う。)

- (1) 測定された光学的キャラクターの変化のカーブを描く。
- (2) 当該カーブを微分する。
- (3) 得られた各ピークの高さを測定する。又は各ピークを積分してピークの面積を求める。
- (4) 各ピークの中から一つの基準ピーク (基準標的核酸のピーク) を選び、基準ピークの高さ又はピーク面積に対する他の標的核酸のピークの高さ又はピーク面積の比 (他の標的核酸のピーク高さ/基準核酸ピークの高さ、又は他の標的核酸のピーク面積/基準核酸ピーク面積) を求める。
- (5) 基準核酸と比較の存在比を求める。

【0179】

QProbe は、標的遺伝子と解離した際には、蛍光色素とグアニン間の相互作用は解消され、再び蛍光を発するようになる。よって、温度変化させながら、蛍光を連続的にモニタリングすることで、解離曲線を迅速・簡便に得ることが出来る。解離曲線を微分することで解離ピークを得ることが出来るが、解離ピーク的面積比 (又は、解離ピークの高さ比) は、遺伝子構成比に依存する。本法では、この解離ピークから遺伝子構成比を求める。

【0180】

4. 発明 d

次の新規混合物及び核酸測定方法からなる。

1) 新規混合物

下記タイプの多重標識核酸プローブを 1 種若しくは複数種含むことを特徴とする新規混合物。

【0181】

多重標識核酸プローブ: 1 本鎖のオリゴヌクレオチドの部位 1 ~ 部位 n (末端塩基部、鎖中部を含む。n は 10、好適には 5、より好適には 3) の塩基シトシン (C) 部位 (塩基部、糖部、リン酸部を含む。) を、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素 1 ~ 色素 n (n は 10、好適には 5、より好適には 3) で、各部位を各々異なった 1 種の色素で標識し、更に部位 1 ~ 部位 n とは異なった位置にあり、且つ対応する標的核酸の塩基が G 以外のものである部位の塩基を C に替えた C 部位 (塩基部、糖部、リン酸部を含む。) を、蛍光色素 1 ~ 色素 n とは異なった蛍光色素で、且つ標識部位の塩基に対応する標的核酸が G の場合、標的核酸とハイブリダイズしたときに光学的キャラクターが変化する蛍光色素で標識した多重標識核酸プローブ。

【0182】

以下の場合、更に好適になる。

- (1) 二重標識核酸プローブが Q プローブである前記に記載の新規混合物。

なお、上記の核酸プローブの具体的形態は、上記に特徴づけた点を除いて、好適には第 1 発明の場合と同様である。

【0183】

なお、上記の核酸プローブの具体的形態は、上記に特徴づけた点を除いて、好適には第 1 発明の場合と同様である。

又、標的核酸の 1 つが前記第 2 発明の発明 2 に記載の内部標準核酸であっても構わない。この場合、これを基準にした存在比になる。

【0184】

2) 核酸の新規測定方法

前記に記載の新規混合物に1種若しくは複数種の標的核酸を加えてハイブリダイゼーション反応を行い、反応系の蛍光色素に由来する光学的キャラクター変化を測定し、得られた測定値の比から系に存在する遺伝子の構成比を測定することを特徴とする核酸の新規測定方法である。

【0185】

<QProbeによる遺伝子定量比の定量>

各QProbeのハイブリダイゼーションは、標的遺伝子と内部標準遺伝子とを区別することなく、無差別に起こる。よって、各プローブがどちらの遺伝子にハイブリダイズするかは、各遺伝子の存在比に完全に依存している。このため、QProbe AとQProbe Bの結合比から、遺伝子構成比を求めることが可能となると考えられる。蛍光消光は、QProbe Aでは標的遺伝子に結合した際に、QProbe Bでは内部標準遺伝子に結合した際に、著しく発生するが、QProbe AとQProbe Bの蛍光消光の比は、標的遺伝子と内部標準遺伝子との構成比と正比例の関係にあるため、この蛍光消光率の比から、遺伝子構成比を定量的に求めることが可能となる。

【0186】

本法は、前述したように遺伝子存在比を求める手法であるため、標的遺伝子と内部標準遺伝子を合わせた濃度が、QProbe AとQProbe Bを合わせた濃度より高い場合（遺伝子よりプローブ濃度が高い場合）であっても、内部標準遺伝子の濃度が構成比を求めるのに適正な濃度であれば（内部標準遺伝子の濃度が、標的遺伝子濃度に十分近ければ）、標的遺伝子と内部標準遺伝子の構成比を求めることが可能であり、その結果、標的遺伝子濃度を正確に定量することが出来る。

【0187】

このため本法は、1) 標的遺伝子を含む溶液を希釈する必要性がない、2) プローブ添加濃度は、蛍光検出に使用する装置が、検出可能な範囲内において、最も低い濃度に設定すれば良く、その濃度を変化させる必要性がない。つまり、本法は、1) 標的遺伝子の希釈工程が不要、2) プローブの濃度を変化させることが不要、といった特徴を有しており、前述の既存法の問題点を解決することが可能である。

【実施例】

【0188】

<実施例1>

2つのQProbeを含む新規混合物及びそれを用いた遺伝子の新規測定方法

新規混合物

下記の組成からなる新規混合物を作製した。

- ・下記のQProbe A（標的遺伝子検出用QProbe）：200nM
- ・下記のQProbe B（内部標準遺伝子検出用）：200nM
- ・下記の内部標準核酸：下記の濃度のものを各々作製した。

a) 200nMの1/10、1/5、1/2、4/5、9/10のもの。

b) 800nMの1/10、1/5、1/2、4/5、9/10のもの。

- ・バッファー： 10mM Tris-HClバッファー（pH:8.3）、KCl:50mM、MgCl₂:1.5mM

【0189】

新規測定方法

(1) 実験方法

標的遺伝子を前記の新規混合物に添加し、2つのQProbeを用いて、その存在比を求めることが可能であるか検討した。実験では、標的遺伝子と内部標準遺伝子との存在比を変化させたDNA溶液を作成し、そこに標的遺伝子検出用QProbeと、内部標準遺伝子検出用QProbeを添加後、蛍光測定を実施した。蛍光測定は、60℃と95℃で実施した（60℃における測定値はプローブとそのターゲット遺伝子が結合した際の蛍光値であり、95℃における測定値はプローブとそのターゲット遺伝子が完全に解離した際の蛍光値であると考えら

れる。)。なお95℃の蛍光値は、蛍光消光率を求める際のリファレンスとした。そして各プローブの蛍光消光率の比と、標的遺伝子と内部標準遺伝子の構成比との関係を調べ、この関係式から、遺伝子構成比が定量可能であるか検討した。

以下に、詳細な実験条件を示す。

【0190】

(2) 実験条件

・標的遺伝子および内部標準遺伝子

標的遺伝子および内部標準遺伝子：オリゴDNAを用いた。

オリゴ合成：エスベックオリゴサービス株式会社（つくば）による委託製造。 標的遺伝子の配列：5'-AGTTCCGAAAGGCCAGAGGAG-3'

内部標準遺伝子の配列：5'-GGTTCGAAAGGCCAGAGGAA-3'

内部標準遺伝子と標的遺伝子を合わせたトータルの終濃度：200nM、800nM（標的：内部標準=9:1、4:1、1:1、1:4、1:9）

【0191】

・QProbe

合成：エスベックオリゴサービス（株）による委託製造。

配列：5'-CTCCTCTGGCCTTTCCGGAACC-3'

色素：QProbe A（標的遺伝子検出用QProbe）はBODIPY FL（Molecular probes社製、D-6140）で、QProbe B（内部標準遺伝子検出用）はTAMRA（Molecular probes社製、C-6123）にて蛍光標識。

各QProbeの終濃度：200nM（トータルで400nM）

・バッファー：10mM Tris-HClバッファー（pH：8.3）、KCl：50mM、MgCl₂：1.5mM

・使用装置：蛍光測定は、温度調節装置（社製）の付属したLS50B（パーキンエルマー社製）にて行った。QProbe Aの測定波長は、励起波長：480nm、蛍光波長：520nmにて実施し、QProbe Bの測定波長は、励起波長：550nm、蛍光波長：580nmにて実施した。

【0192】

蛍光測定は、ハイブリダイズした際の蛍光測定は、60℃で実施した。また、リファレンスとして完全にプローブからデバイブリする温度（95℃）の蛍光強度を測定し、下式より蛍光消光率を求めた。

$$\text{蛍光消光率}(\%) = (1 - (F60/F95) / ((F60\text{プローブのみ}/F95\text{プローブのみ})) \times 100$$

F60：ターゲット遺伝子存在下での60℃の蛍光強度値

F95：ターゲット遺伝子存在下での95℃の蛍光強度値

F60プローブのみ：ターゲット遺伝子非存在下での60℃の蛍光強度値

F95プローブのみ：ターゲット遺伝子非存在下での95℃の蛍光強度値

【0193】

(3) 実験結果および考察

実験結果を図5として示す。本グラフから、標的遺伝子／内部標準遺伝子の構成比と、QProbe A消光率／QProbe B消光率との間には高い相関があることが明らかとなった。よって、本関係式を検量線として用いることにより、本手法によって標的遺伝子の定量が可能であることが示唆された。

【0194】

また、標的遺伝子および内部標準遺伝子のトータル量が、プローブ添加量より多い場合（800nM）においても、少ない場合（200nM）と同様の相関が観察されたことから、本測定法では、ターゲットとなる遺伝子量が、プローブより多い場合であっても、正確に定量可能であることが示唆された。以上より、本手法は1)標的遺伝子の希釈工程が不要、2)プローブの濃度を変化させることが不要、といった特徴を有する遺伝子定量手法であることが示された。

【0195】

<実施例2>

2-2 グアニンとの相互作用により消光する新規色素のスクリーニング

(1) 実験方法

プローブ配列の 3' 末端を C とし、その C に各種の蛍光色素にてラベルしたプローブを作成した。作成したプローブとその相補鎖を、溶液中でハイブリダイズさせ、蛍光消光率を求めた。

【0196】

実験の手順は、

(2) 実験条件

・ 標的遺伝子

標的遺伝子：オリゴDNAを用いた。

オリゴ合成：エスベックオリゴサービス株式会社（つくば）による委託製造。 標的遺伝子の配列：3' ggggggggggggAAAAAA5'

終濃度：320nM

・ プローブ

合成：エスベックオリゴサービス（株）による委託製造。

配列：5' CCCCCCCCCCCTTTTT3'

色素：PacificBlue (P-10163)、TET (C-6166)、TBSF (C-6166)、HEX (T-20091)、R6G (C-6127) を使用した。

プローブの終濃度：40nM

・ バッファー： 10mM Tris-HCl バッファー (pH: 8.3)、KCl: 50mM、MgCl₂: 1.5mM

【0197】

・ 使用装置

蛍光測定は、温度調節装置（社製）の付属したLS50B（パーキンエルマー社製）にて行った。

蛍光測定の条件は、各色素の最大励起波長と最大蛍光波長を、LS50Bを用いて求め、蛍光消光率を求める際には、得られた最大励起波長と最大蛍光波長にて蛍光測定を実施した。各色素の最大励起波長と最大蛍光波長は、結果で示す。スリット幅は、励起波長と蛍光波長ともに5nmとした。

【0198】

実験の手順を図 8 に示す。蛍光測定は、35℃で実施した。

【0199】

蛍光消光率は下式より求めた。

$$\text{蛍光消光率 (\%)} = (\text{測定値 (i)} - \text{測定値 (ii)}) \div \text{測定値 (i)} \times 100$$

【0200】

(3) 実験結果および考察

下表から分かるように、全ての色素で蛍光消光が確認された。特にPacificBlueとR6Gでは蛍光消光が著しく、これまで知られている色素よりも高い消光率が得られた。また、PacificBlue（新規実施分）、R6G（新規実施分）、BODIPY FL（既知色素）、TAMRA（既知色素）の蛍光キャラクターとはそれぞれ異なるため、上記の色素で標識した4種のプローブを用いることで、同じ試料中に存在する4種遺伝子の同時検出が可能であると考えられる。

【0201】

表 2 : 蛍光色素と消光率との関係

蛍光色素		蛍光消光率 (%)	最大励起波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)
新規実施分	PacificBlue (P-10163)	94.0	395	450
	TET (C-6166)	56.6	515	530
	TBSF (C-6166)	86.5	520	540
	HEX (T-20091)	68.3	530	542
	R6G (C-6127)	93.1	517	543
既知色素	BODIPY FL (D-6140)	91.8	499	522
	TAMRA (C-6123)	89.2	547	579

【0202】

<実施例3>

2-3 Switching probeを用いた遺伝子定量法

新規混合物

下記の組成からなる新規混合物を作製した。

- ・下記のSwitching probe: 400nM
- ・下記の内部標準核酸: 下記の濃度のものを各々作製した。
- a) 600nMの1/10、1/5、1/2、4/5、9/10のもの。
- ・バッファー: 10mM Tris-HClバッファー (pH:8.3)、KCl:50mM、MgCl₂:1.5mM

【0203】

又、Switching probeの実験データを検証するために、上記の反応液において、Switching probeに代えてQProbe AとQProbe Bを含有させた新規混合物を作製した。

- ・下記のQProbe A (標的遺伝子検出用): 200 nM
- ・下記のQProbe B (内部標準遺伝子検出用): 200 nM

【0204】

新規測定方法

標的遺伝子を前記の新規混合物に添加し、標的遺伝子を測定した。また、Switching probeを用いた際に得られる蛍光消光率と、2つのQProbeを用いた際に得られる蛍光消光率とを比較した。

【0205】

(1) 実験方法

Switching probeを用いることでも、前述の2種のQProbeを用いた場合と同様、その存在比を求めることが可能であるか検討した。また、Switching probeを用いた際に得られる蛍光消光率と、2つのQProbeを用いた際に得られる蛍光消光率とを比較した。

【0206】

以下に、詳細な実験条件を示す。

(2) 実験条件

- ・標的遺伝子および内部標準遺伝子
- ・標的遺伝子および内部標準遺伝子: オリゴDNAを用いた。
- ・オリゴ合成: エスペックオリゴサービス株式会社 (つくば) による委託製造。 標的遺

伝子の配列（下線がプローブとハイブリダイズする配列）

5'-TTTGGATGACTGACTGACTGACTGACGAGATTT-3'

内部標準遺伝子の配列（下線がプローブとハイブリダイズする配列）

5'-TTTAGATGACTGACTGACTGACTGACGAGGTTT-3'

内部標準遺伝子と標的遺伝子を合わせたトータルの終濃度：600nM（標的：内部標準＝9：1、4：1、1：1、1：4、1：9）

・QProbe

合成：エスベックオリゴサービス（株）による委託製造。

【0207】

Switching probeの配列と構造

BODIPY FL-5' CCTACTGACTGACTGACTGACTGCTCC3' -TAMRA

QProbeの配列と構造

<QProbe A（標的遺伝子検出用）>

BODIPY FL-5' CCTACTGACTGACTGACTGACTGCTCC3'

<QProbe B（内部標準遺伝子）>

5' CCTACTGACTGACTGACTGACTGCTCC3' -TAMRA

なお、使用した蛍光色素は、実施例1と同様である。

【0208】

終濃度：400nM（2種のQProbeを使用する場合はトータルで400nM）

・バッファー：10mM Tris-HClバッファー（pH：8.3）、KCl：50mM、MgCl₂：1.5mM

・使用装置、使用機器、測定条件、蛍光消光率の求め方は、実施例2-1と同様である。

【0209】

（3）実験結果および考察

BODIPY FLは5'末端のCに標識されているため、標的遺伝子とハイブリダイズした際に著しき蛍光消光する。一方、TAMRAは3'末端のCに標識されているため、内部標準遺伝子とハイブリダイズした際に著しき蛍光消光する。よって、BODIPY FLの蛍光消光率とTAMRAの蛍光消光率との比は、標的遺伝子と内部標準遺伝子との比と高い相関があると考えられる。実験結果を図6として示す。本グラフから、BODIPY FLの蛍光消光率とTAMRAの蛍光消光率との比と、標的遺伝子／内部標準遺伝子の構成比との間には高い相関があることが確認された。本結果より、Switching probeを用いても、標的遺伝子の定量が可能であることが示された。

【0210】

Switching probeの際に得られた蛍光消光率と、2種のQProbeを用いた場合に得られたSwitching probeの際に得られた蛍光消光率を比較した。その結果を表3に示す。本表からも、Switching probeで得られた蛍光消光率は、2種のQProbeを用いた際に得られた蛍光消光率よりも約2倍高い数値を示した。このことから、2種のQProbeを用いる手法より、Switching probeを用いる手法のほうが、より精度良く標的遺伝子の定量を実施できることが示された。

【0211】

表3: Switching probeを用いた際の消光率と、2種のQProbeを用いた際の消光率との比較

	結果		条件		
			プローブ濃度 (nM)	ターゲット種	ターゲット濃度 (nM)
Switching probe の場合	BODIPY FL 消光率	35.2 %	400	標的遺伝子	600
	TAMRA 消光率	72.5 %	400	内部標準遺伝子	600
2種QProbe の場合	QProbe A 消光率	21.2 %	400	標的遺伝子	600
	QProbe B 消光率	44.2 %	400	内部標準遺伝子	600

【0212】

<実施例4>

2-4 遺伝子増幅法を介したエンドポイント遺伝子定量法

(1) 実験方法

遺伝子増幅を介したエンドポイント遺伝子定量法について、正確に標的遺伝子量を定量出来るか確認した。遺伝子増幅法は、PCR法を採用し、プローブはSwitching Probeを採用した。

【0213】

(2) 実験条件

・標的遺伝子および内部標準遺伝子

標的遺伝子: 遺伝子組換え大豆 (ラウンドアップ大豆) RRS遺伝子のPCR産物 標的遺伝子の配列: 5'-AGTTCCGGAAGGCCAGAGGAG-3'

(下線が内部標準遺伝子と異なる部分。表記した配列にプローブが結合する。これ以外の配列は、標的遺伝子、内部標準遺伝子共に共通であるため表示しなかった。)

内部標準遺伝子: 遺伝子組換え大豆 (ラウンドアップ大豆) のRRS遺伝子に変異を人為的に挿入したPCR産物

内部標準遺伝子の配列: 5'-GGTTCGGAAGGCCAGAGGAA-3'

(下線が標的遺伝子と異なる部分。表記した配列にプローブが結合する。)

これ以外の配列は、標的遺伝子、内部標準遺伝子共に共通であるため表示しなかった。)

【0214】

内部標準遺伝子と標的遺伝子を合わせたトータルの終濃度: 1000copy

内部標準遺伝子と標的遺伝子との初期構成比: 標的: 内部標準=9:1、4:1、1:1、1:4、1:9

・Switching Probeの製造

合成: エスベックオリゴサービス株式会社 (つくば) による委託製造。

Switching probeの配列と構造

BODIPY FL-5' CTCCTCTGGCCTTTCCGGAACC3' -TAMRA

(色素はこれまでと同様)

プローブ終濃度: 400nM

【0215】

・PCR条件

Denature: 95℃ (60秒)

Annealing: 56℃ (60秒)

Extension: 72℃ (60秒)

- ・ 遺伝子増幅用酵素: TaqポリメラーゼはGeneTaq (日本ジーン社製) を用いた。

【0216】

- ・ プライマー

合成: エスベックオリゴサービス株式会社 (つくば) による委託製造。

フォワードプライマー配列:

5' CCTTTAGGATTTTCAGCATCAGTGG3'

リバースプライマー配列: 5' GACTTGTCGCCGGAATG3'

プライマー終濃度: 各1000nM

【0217】

- ・ 内部標準遺伝子の製造

目的とする内部標準遺伝子配列を有するオリゴDNAを、エスベックオリゴサービス株式会社 (つくば) に製造委託した。得られたオリゴDNAを鋳型として上記の検出用プライマーを用いてPCR増幅し、得られた産物を、Microcon PCR (ミリポア社製) にて精製した。精製の後に、PicoGreen (Molecular probes社製) を用いて定量し、これを内部標準遺伝子として用いた。

【0218】

- ・ 標的遺伝子PCR産物の製造

内部標準遺伝子の作成と同様の方法で実施した。

- ・ 使用装置と測定条件

蛍光消光率を求める際の使用機器、測定条件、蛍光消光率の求め方は、実施例2-1と同様である。

PicoGreenを用いた定量での測定波長は、励起波長: 480nm、蛍光波長: 520nmにて実施した。スリット幅は、何れの場合も5nmとした。PCR反応は、サーマルサイクラー (iCycler、バイオラッド社製) を用いて実施した。

【0219】

(3) 実験結果

BODIPY FLの蛍光消光率とTAMRAの蛍光消光率との比は、標的遺伝子と内部標準遺伝子との比との関係式を求めた結果、両者の間には高い相関が見られた (図7参照)。この結果から、標的遺伝子と内部標準遺伝子とは、初期の遺伝子構成比を保ったまま増幅された事が示唆された。また、本結果から、遺伝子増幅法を介した場合も、本手法により、標的遺伝子の定量が可能であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0220】

本願の新規混合物を前記のような効果を生ずる核酸測定方法になる。それで本願発明は、遺伝子工学、医薬、医療技術、農業技術、各種のバイオ技術の開発、廃棄物処理プラントにおける複合微生物の開発等に大いに貢献するものである。

【図面の簡単な説明】

【0221】

【図1】 QProbeを用いた標的遺伝子と内部標準遺伝子の検出の模式図である。

【図2】 QProbe用いた解離曲線 (Tm) 解析による遺伝子定量方法の模式図である。

【図3】 二重標識QProbe (Switching probe) 用いた遺伝子定量方法の模式図である。

【図4】 競合的PCR方法の原理の模式図である。

【図5】 消光率の比と遺伝子構成比との関係 (2種のQProbeを使用した場合) を示す図である。

【図6】 消光率の比と遺伝子構成比との関係 (Switching probeを使用した場合) を示す図である。

【図7】 消光率の比と核酸増幅反応 (PCR) 前の遺伝子構成比との関係 (Switching probeを使用し、遺伝子増幅方法を介したエンドポイント遺伝子定量法を使用した場合

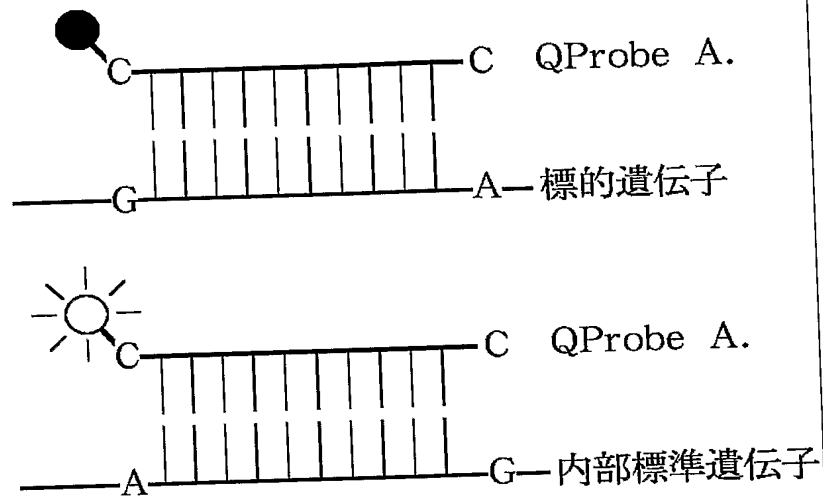
) を示す図である。

【図 8】 実施例 2 の実験手順を示す図である。

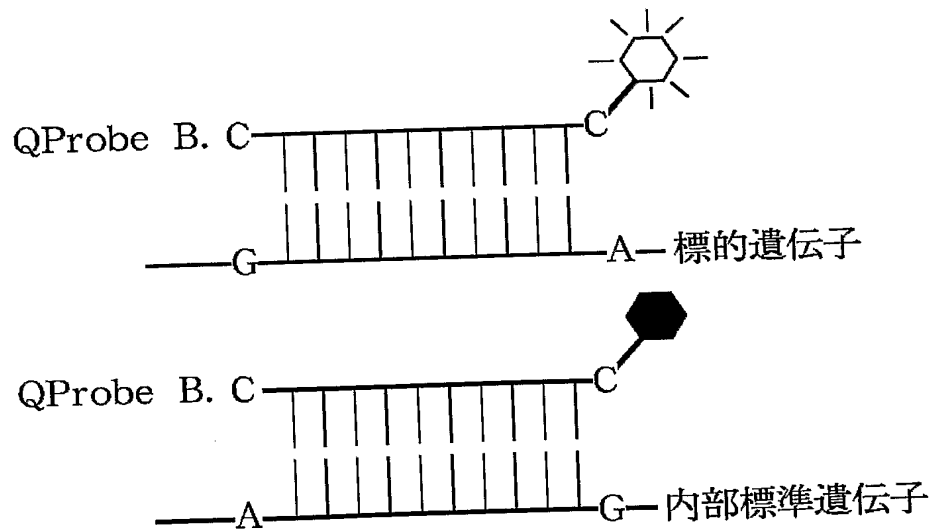
【書類名】図面

【図 1】

QProbe A. (標的検出用 QProbe) の場合

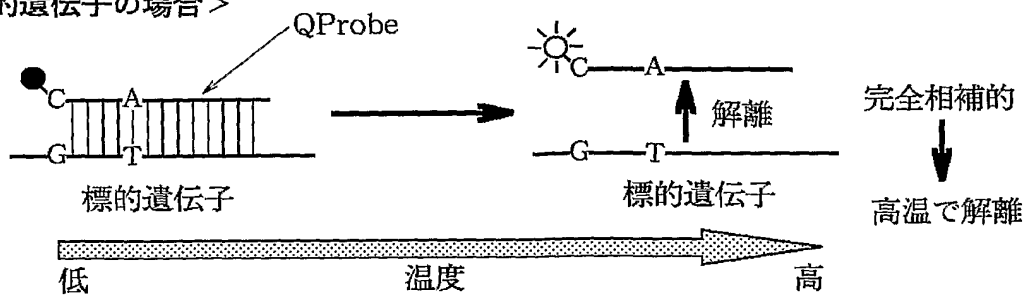


QProbe B. (内部標準検出用 QProbe) の場合

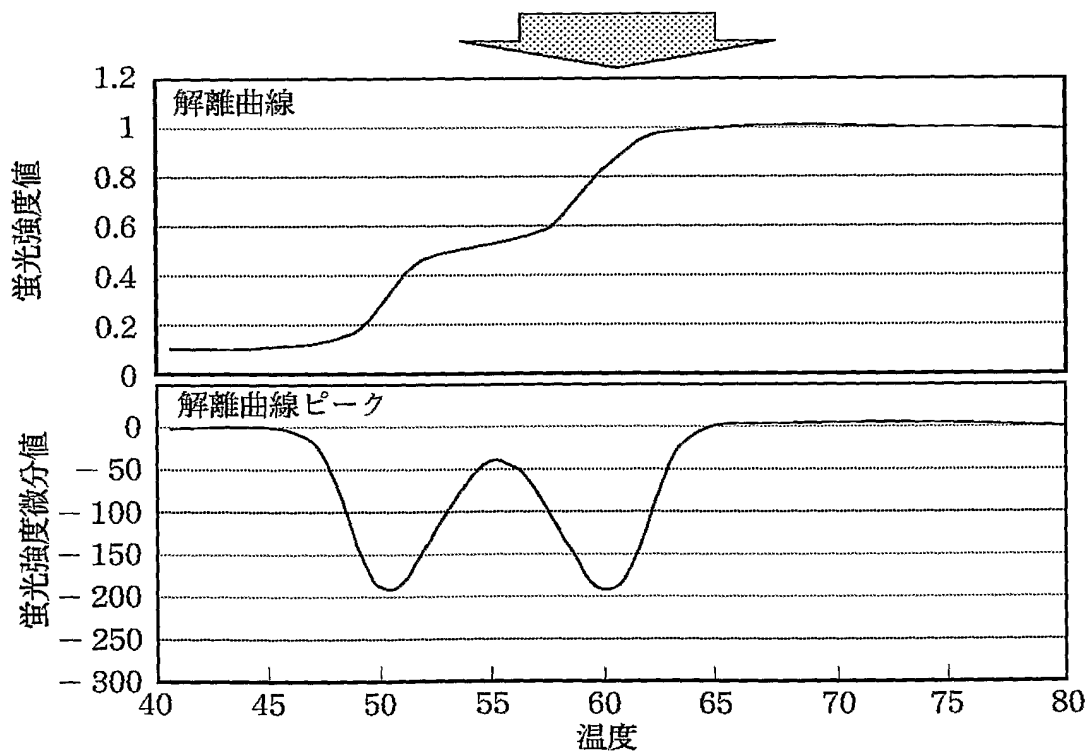
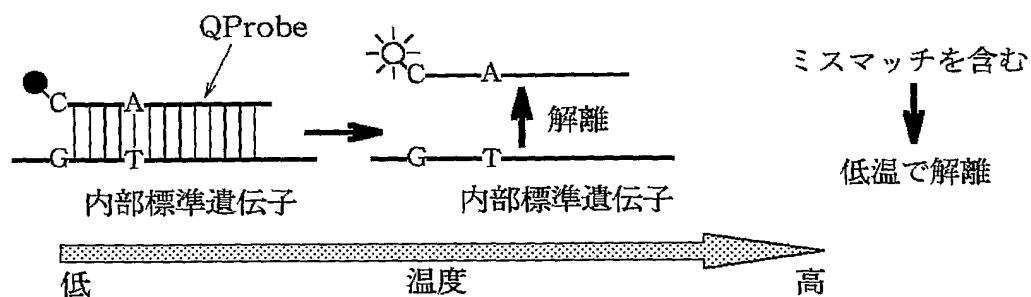


【図 2】

<標的遺伝子の場合>



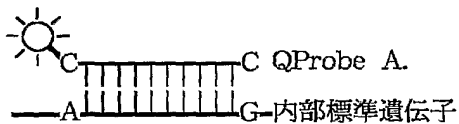
<内部標準遺伝子の場合>



【図 3】

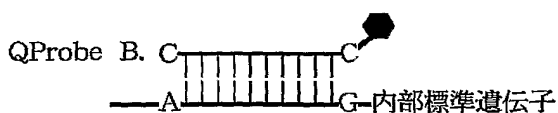
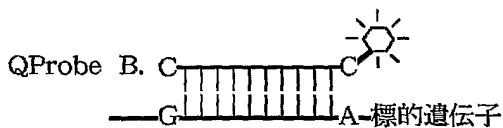
<2つのQProbeを使用する場合>

QProbe A. (標的検出用QProbe)の場合



- ・内部標準遺伝子と結合しても蛍光消光しない

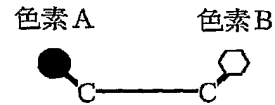
QProbe B. (内部標準検出用QProbe)の場合



- ・標的遺伝子と結合しても蛍光消光しない

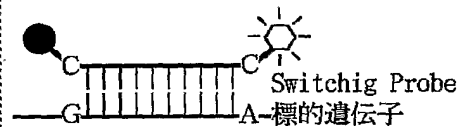
<Switching QProbeを使用する場合>

Switching Probeの構造

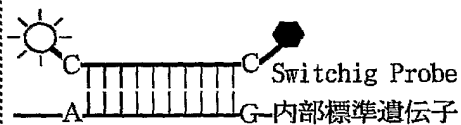


- ・両末端がシトシン
- ・両末端が異なる色素で標識されている

標的遺伝子と結合した場合



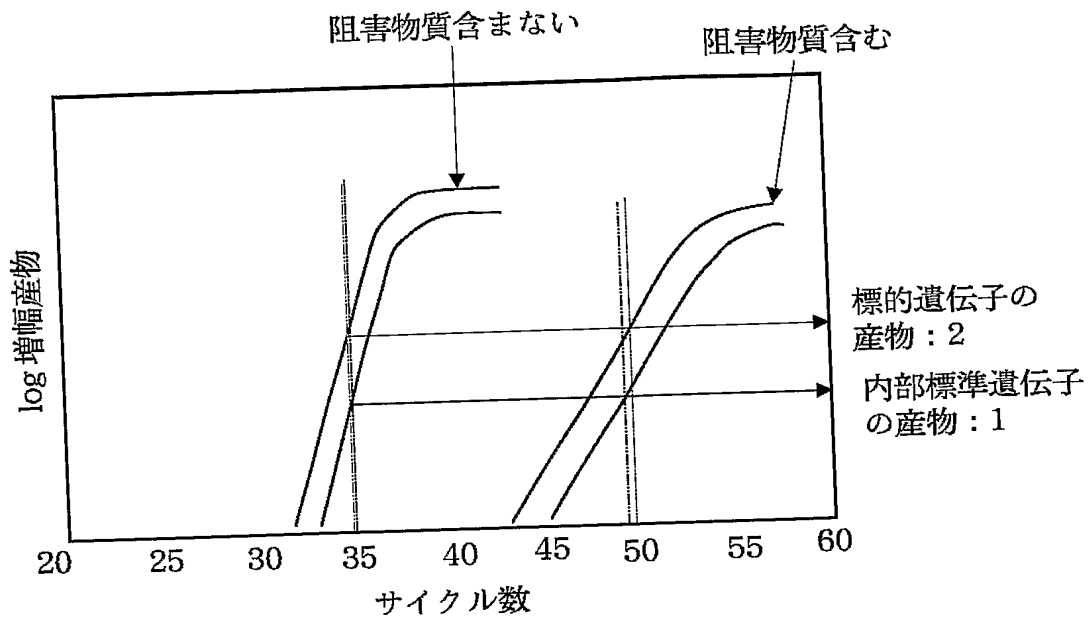
内部標準遺伝子と結合した場合



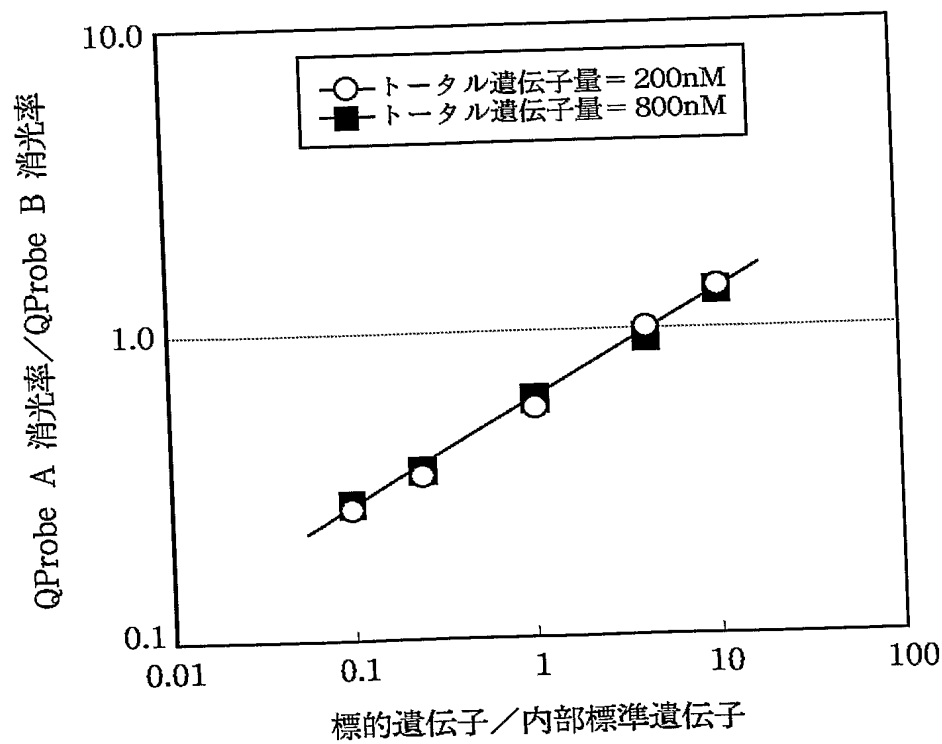
- ・どちらの遺伝子と結合しても、どちらかの末端の蛍光色素が消光

【図 4】

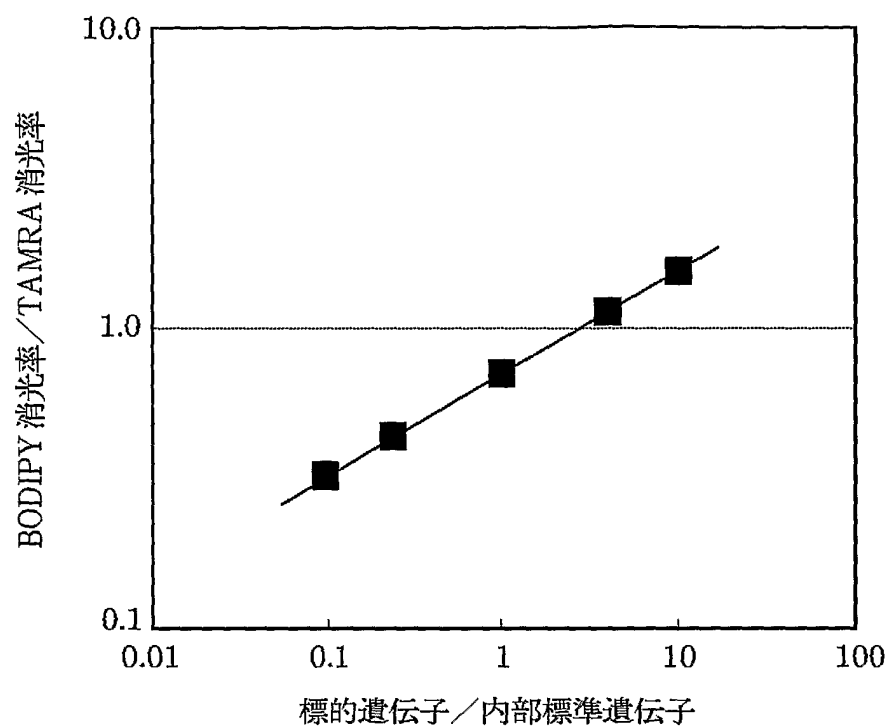
標的遺伝子 : 内部標準遺伝子 = 2 : 1



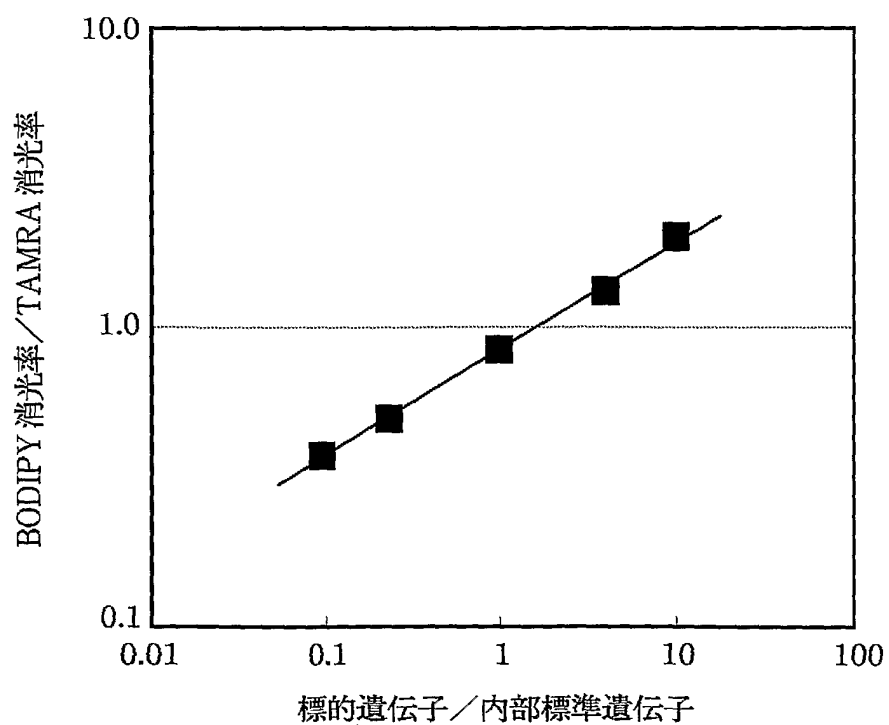
【図 5】



【図 6】

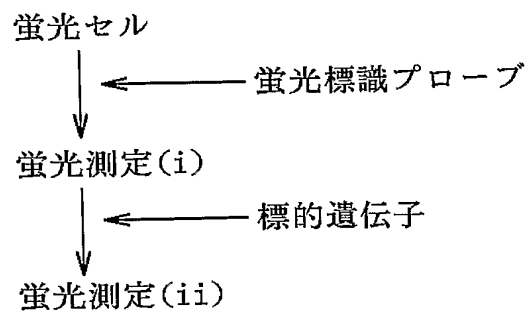


【図 7】



【図 8】

<実験手順>



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸測定において、1) 標的核酸の希釈工程が不要、2) 標的核酸濃度に合わせてプローブの濃度を変化させることが不要、といった特徴を有する核酸測定方法を可能とする標的核酸測定用の新規混合物を提供すること。

【解決手段】 1) 1種の内部標準核酸、1種の蛍光色素で標識された2種の核酸プローブを含む混合物、2) 1種の1部変異を有する内部標準核酸、1種の蛍光色素で標識された核酸プローブを含む、Km値測定のための混合物、3) 1種の内部標準核酸、2種の蛍光色素で標識された2重核酸プローブを含む混合物。当該混合物を用いた核酸測定方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 2 3 7 7 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 5 6 5 8 1]

1. 変更年月日	1 9 9 6 年 8 月 2 7 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都千代田区東神田一丁目 9 番 8 号
氏 名	環境エンジニアリング株式会社

特願 2 0 0 3 - 4 2 3 7 7 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所